



**HAL**  
open science

# Variabilité et déterminants de la bioaccumulation des métaux par les poissons marins : cas du Grand Ecosystème Marin du Courant des Canaries

Gaël Le Croizier

► **To cite this version:**

Gaël Le Croizier. Variabilité et déterminants de la bioaccumulation des métaux par les poissons marins : cas du Grand Ecosystème Marin du Courant des Canaries. Sciences de la Terre. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2017. Français. NNT : 2017BRES0047 . tel-01615813

**HAL Id: tel-01615813**

**<https://theses.hal.science/tel-01615813v1>**

Submitted on 12 Oct 2017

**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.



université de bretagne  
occidentale

UNIVERSITE  
BRETAGNE  
LOIRE

THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

*sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

*Mention : Biologie Marine*

École Doctorale des Sciences de la Mer

présentée par

**Gaël Le Croizier**

Préparée à l'Unité Mixte de Recherche LEMAR

UMR 6539 CNRS / IRD / UBO

Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin

# Variabilité et déterminants de la bioaccumulation des métaux par les poissons marins

## Cas du Grand Ecosystème Marin du Courant des Canaries

**Thèse soutenue le 13 juin 2017**

devant le jury composé de :

**Krishna DAS**

Chargée de recherche, Université de Liège, Liège /  
*Rapporteur*

**Patrice COUTURE**

Professeur, INRS-ETE, Québec /  
*Rapporteur*

**Fabienne GUERARD**

Professeur, Université de Bretagne Occidentale, Brest /  
*Examinateur*

**Tiphaine CHOUVELON**

Chargée de recherche, IFREMER, Nantes /  
*Examinatrice*

**Raymond LAE**

Directeur de recherche, IUEM, LEMAR, Brest /  
*Directeur de thèse*

**Luis TITO DE MORAIS**

Directeur de recherche, IUEM, LEMAR, Brest /  
*Directeur de thèse*



La vie trouve toujours un chemin.

Professeur Ian Malcolm



# Table des matières

INTRODUCTION GENERALE .....	1
<b>1. LE GRAND ECOSYSTEME MARIN DU COURANT DES CANARIES.....</b>	<b>3</b>
Spécificités environnementales .....	3
Contexte halieutique .....	6
<b>2. LA CONTAMINATION METALLIQUE .....</b>	<b>7</b>
Sources .....	8
Spéciation des métaux .....	9
Toxicité des métaux.....	10
<b>3. LA BIOACCUMULATION DES METAUX PAR LES ORGANISMES MARINS .....</b>	<b>11</b>
Voies d'assimilation.....	12
Transport et séquestration des métaux .....	13
Transfert trophique .....	14
<b>4. VARIABILITE INTER ET INTRASPECIFIQUE .....</b>	<b>15</b>
Observations expérimentales.....	15
Observations en milieu naturel .....	16
<b>5. PARAMETRES DETERMINANT LA BIOACCUMULATION .....</b>	<b>18</b>
Paramètres physiologiques .....	18
Paramètres écologiques .....	21
<b>6. OBJECTIFS DE LA THESE .....</b>	<b>23</b>
APPROCHES ET OUTILS.....	25
<b>1. APPROCHE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>26</b>
Le bar européen .....	27
La sole sénégalaise .....	28
Choix des espèces.....	29
Protocole expérimental.....	29
Dosage des métallothionéines .....	31
Répartition du cadmium entre organes et au sein des cellules .....	32
<b>2. APPROCHE EN MILIEU NATUREL .....</b>	<b>35</b>
Echantillonnage .....	35
Analyse des métaux.....	38
Analyse des isotopes stables du carbone et de l'azote .....	38
Analyse de la composition en acides gras des lipides neutres .....	41
PARTIE 1 : LES DETERMINANTS PHYSIOLOGIQUES DE L'ACCUMULATION DES METAUX PAR LES POISSONS MARINS .....	45
Chapitre 1 .....	47
<b>1. RESUME .....</b>	<b>48</b>
<b>2. ARTICLE N° 1 .....</b>	<b>51</b>
Abstract .....	52
Introduction.....	55
Materials and methods .....	58

Fish and experimental procedures .....	58
Monitoring and biological sampling .....	59
Cadmium analysis.....	60
Metallothionein analysis .....	61
Data analysis.....	62
<b>Results .....</b>	<b>62</b>
Cadmium kinetics .....	62
Organotropism .....	68
Metallothioneins .....	70
<b>Discussion .....</b>	<b>72</b>
Environmental relevance of the measured Cadmium and Metallothioneins concentrations.....	72
Metallothioneins induction .....	74
Metallothioneins significance in the fate of Cadmium in fish tissues .....	75
<b>Conclusion .....</b>	<b>80</b>

Chapitre 2 ..... **81**

**1. RESUME .....** **83**

**2. ARTICLE N° 2 .....** **85**

Abstract .....	86
Introduction.....	87
Materials and methods .....	88
Fish and experimental procedures.....	88
Biological sampling.....	89
Subcellular partitioning procedure.....	89
Metal analyses.....	90
Data analysis.....	90
Results and Discussion .....	91
Impact of Cadmium exposure on Cadmium and essential metals partitioning.....	91
Link between subcellular Cadmium handling and Cadmium toxicity in both species .....	95
Essential metals protection against Cadmium toxicity in both species.....	100
Link between Cadmium partitioning and hepatic excretion .....	101

PARTIE 2 : LES DETERMINANTS ECOLOGIQUES DE L'ACCUMULATION DES METAUX PAR LES POISSONS MARINS ..... 103

Chapitre 3 ..... **105**

**1. RESUME .....** **106**

**2. ARTICLE N° 3 .....** **108**

Abstract .....	109
Introduction.....	110
Material and methods .....	112
Study area and sampling .....	112
Trace metal analysis .....	114
Stable isotopes .....	115
Fatty acids .....	115
Data analyses .....	117
Results .....	118
Stable isotopes .....	118
Fatty acid analysis .....	119
Trace metal analysis .....	123
Correlations between metals and trophic markers.....	125
Discussion .....	126
Stable isotope analysis .....	126
Fatty acid analysis .....	127
Metal concentration differences between trophic groups .....	132
Differences in accumulation patterns between communities .....	134
Conclusion .....	137

Chapitre 4 .....	139
1. RESUME .....	140
2. ARTICLE N° 4 .....	142
Abstract .....	143
Introduction.....	144
Materials and methods .....	145
Sampling.....	145
Chemical analyses .....	146
Data analyses .....	149
Results and Discussion .....	149
Spatial variations in stable isotope ratios and mercury .....	149
Mercury accumulation variability at the species level .....	153
Mercury accumulation variability at the individual level .....	156
Impact of Hg concentrations on consumer health .....	161
 DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....	 163
1. LA BIOACCUMULATION DES METAUX PAR LES POISSONS MARINS .....	166
2. ORIGINE DES ELEMENTS METALLIQUES.....	170
Naturelle <i>versus</i> industrielle.....	170
Voies de transfert trophique .....	172
3. TRACEURS ECOLOGIQUES .....	173
Divergence entre traceurs.....	173
Les métaux : traceurs de la variabilité intraspécifique.....	177
4. CONCLUSION.....	179
 BIBLIOGRAPHIE.....	 181
ANNEXES.....	209





# Liste des figures

- Figure 1 Représentation schématique du fonctionnement d'un système d'Upwelling (www.wikipedia.org). ..... 3
- Figure 2 Les quatre principaux systèmes d'upwelling de bord est. Le gradient de couleur représente la concentration en chlorophylle ( $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$ ). L'histogramme « NP » représente les apports journaliers en nitrate liés à l'upwelling, et « PP » indique la production primaire journalière moyenne ( $\text{gC}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ ). D'après Messié et Chavez 2015. .... 4
- Figure 3 Localisation des centres d'upwelling et leur saisonnalité dans le système de courant des Canaries. Adapté de Taleb (2005). ..... 5
- Figure 4 Contribution moyenne (%) de différents groupes aux captures annuelles réalisées entre 2000 et 2010 sur l'ensemble de la zone de pêche du CCLME (www.fao.org/fishery, 2015). ..... 7
- Figure 5 Concentration en cadmium ( $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  de poids sec) dans le muscle de trois espèces de petits poissons pélagiques échantillonnés durant la campagne EPURE au large du Maroc. Le maquereau espagnol *Scomber japonicus* ( $n=38$ ) présente une concentration en Cd plus élevée (ANOVA suivie d'un test de comparaisons multiples de Tukey ;  $p<0,001$ ) que la sardine commune *Sardina pilchardus* ( $n=31$ ) et que le chinchard noir *Trachurus trecae* ( $n=31$ ). De Masski et al. (*com. pers.*). ..... 16
- Figure 6 Le bar européen *Dicentrarchus labrax*. ..... 27
- Figure 7 La sole sénégalaise *Solea senegalensis*. ..... 28
- Figure 8 Schéma du dispositif expérimental impliquant 2 espèces (bar et sole) et deux conditions (témoins et contaminés). Chaque bassin contient 50 individus pour le bar et 40 pour la sole afin de respecter des densités similaires. Deux études ont été menées, la première impliquant une exposition à 3,5 ppm de cadmium, l'autre à 22,9 ppm. .... 30
- Figure 9 Protocole de séparation des différentes fractions subcellulaires appliqué au foie de *D. labrax* et *S. senegalensis*. MRG : granules riches en métaux ; HSP : protéines stables à la chaleur incluant les métallothionéines ; HDP : protéines dénaturées à la chaleur. Adapté de (Rosabal et al., 2015). ..... 34
- Figure 10 Carte des sites de prélèvements au cours de la campagne océanographique AWA en mars 2014. 36
- Figure 11 Fractionnement trophique du carbone et de l'azote dans deux chaînes alimentaires supportées par différents producteurs primaires (en vert : phytoplancton océanique *versus* macroalgues côtières). En bleu : les consommateurs primaires, en jaune : les consommateurs secondaires (prédateur de niveau I), en rouge : un prédateur de niveau II. Les rapports isotopiques du carbone ( $\delta^{13}\text{C}$ ) sont représentés en abscisse, ceux de l'azote ( $\delta^{15}\text{N}$ ) en ordonnée. .... 40
- Figure 12 Principales voies de biosynthèse des acides gras chez les animaux. Les flèches horizontales indiquent une désaturation, les flèches verticales descendantes correspondent à une élongation, les ascendantes à une  $\beta$ -oxydation. Les D représentent les désaturases non (en pointillés) ou peu (trait plein) actives chez les poissons marins. Les AG en rouge proviennent majoritairement de sources alimentaires. Adapté de Kelly et Scheibling, 2012. .... 43
- Figure 13 Cd concentrations (mean  $\pm$  standard deviation;  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  dry wt) in the muscle of the Sea bass (blue) and the Sole (green) during experiment one (3.5 ppm Cd exposure; A and B) and experiment two

(22.9 ppm Cd exposure; C and D). Different letters indicate significant differences over time among exposed fish (ANOVAs followed by Tukey's HSD tests). "\*" indicates significant differences between exposed and control fish for a same sampling point (ANOVAs)..... 63

Figure 14 Cd concentrations (mean  $\pm$  standard deviation;  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dry wt) in the liver of the Sea bass (blue) and the Sole (green) during experiment one (3.5 ppm Cd exposure; A and B) and experiment two (22.9 ppm Cd exposure; C and D). Different letters indicate significant differences over time among exposed fish (ANOVAs followed by Tukey's HSD tests). "\*" indicates significant differences between exposed and control fish for a same sampling point (ANOVAs)..... 65

Figure 15 Cd concentrations ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dry wt) in the liver of the Sea bass and the Sole during 60 days of exposition to 22.9 ppm of Cd. Slopes of the linear regression curves represent the uptake rate ( $K_u$ )... 66

Figure 16 Cd concentrations (mean  $\pm$  standard deviation;  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  dry wt) in the bile of the Sea bass (blue) and the Sole (green) during experiment one (3.5 ppm Cd exposure; A and B) and experiment two (22.9 ppm Cd exposure; C and D). Different letters indicate significant differences over time among exposed fish (ANOVAs followed by Tukey's HSD tests). "\*" indicates significant differences between exposed and control fish for a same sampling point (ANOVAs)..... 68

Figure 17 Proportion of hepatic Cadmium transported to muscle or excreted through bile (*i.e.* percentage of the ratio of liver Cd concentration on muscle or bile Cd concentration) calculated during the entire experiment. The upper and lower hinges represent the quartiles, the vertical lines, the maximum and minimum data values and the bold line represents the median value. Values are shown for the Sea bass (blue) and the Sole (green) during the two experiments. "\*" indicates significant differences between exposed and control fish for a same sampling point (ANOVAs)..... 69

Figure 18 Metallothionein concentrations (mean  $\pm$  standard deviation;  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dry wt) in the Sea bass and the Sole liver during experiment one (3.5 Cd exposure; upper figure) and experiment two (22.9 ppm exposure; lower figure). Different letters indicate significant differences over time among exposed fish of a same species; "\*" indicates significant differences between control and exposed fish of a same species; MT concentrations were always higher in Sea bass than in Sole regardless of time and condition except at T0 and T10 during experiment two (ANOVAs followed by Tukey's HSD tests)..... 71

Figure 19 Cadmium (Cd) and essential metals subcellular partitioning (% of the total metal contained in each fraction) in the liver of the sea bass *Dicentrarchus labrax* and the Senegalese sole *Solea senegalensis* after 60 days of dietary Cd exposition (left panels) and after 60 days of depuration (right panels). BAM: biologically active metal pool. BIM: biologically inactive metal pool. Cellular debris fraction is not shown as it does not belong to BAM nor BIM, but was taken into account in the calculation of the partitioning (for Cd proportions in Cellular debris, see Supporting Information). "\*" indicates significant difference between species (ANOVA; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ). ..... 96

Figure 20 Subcellular Cd dynamics in hepatocytes of the sea bass *Dicentrarchus labrax* and the Senegalese sole *Solea senegalensis*. Only the two main mechanisms of Cd handling are represented: binding to metallothionein in sea bass and binding to granules in sole. 1: Excretion of Cd/MT complexes through MT transporters; 2: Release in blood; 3: Release in bile; 4: sequestration of metal rich granules by endoplasmic reticulum; 5: damages due to Cd toxicity; 6: vesicular transport; 7: vesicular exocytosis. 99

Figure 21 Total essential metal concentrations (log transformed values, ppm dw) in the liver of the sea bass *Dicentrarchus labrax* and the Senegalese sole *Solea senegalensis* after 60 days of dietary Cd exposition. "\*" indicates significant difference between species (ANOVA; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ). No difference was found in total essential metal concentrations between control and exposed fish of a same species (see Supporting Information). ..... 101

Figure 22 A map showing the two sample stations along the coast of Senegal. .... 113

- Figure 23** Muscle  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  values (‰) of individuals from six species from Dakar (A) and from Casamance (B). The groups were derived from the result of a hierarchical cluster analysis (Ward's method). Group one is shown in green, group two in red and group three in blue in each region. .... 119
- Figure 24** Principal component analysis (PCA) of the fatty acid composition of the liver of six fish species from Dakar (A) and from Casamance (B). The trophic groups (circled) were derived from the result of a hierarchical cluster analysis (Ward's clustering method). Fatty acids that account for more than 75 % of the contribution of dissimilarity between the groups in the similarity of percentages analysis (SIMPER) are shown. .... 121
- Figure 25** Comparison of the trace element concentrations ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dry wt) in the liver of fish from Dakar (A) and from Casamance (B) according to their trophic group. SI group: trophic groups inferred by stable isotopes; FA group: trophic groups inferred by fatty acids. In each region, FA groups one and two included fish feeding mostly on pelagic prey, whereas FA group three contained fish feeding mostly on benthic prey. Different letters indicate significant differences between groups (ANOVAs followed by Tukey's HSD tests or KW tests followed by multiple comparison tests). .... 124
- Figure 26** Sampling sites along the Senegalese coast (West Africa). Saint-Louis, Saloum and Casamance are estuarine sites, while Grande-Côte and Dakar are located along sandy rocky coasts. .... 146
- Figure 27**  $\delta^{13}\text{C}$  (‰; A) and  $\delta^{15}\text{N}$  (‰; B) signatures and mercury (Hg in ppm dry weight; C) concentration in muscles of fish from various sites ("Saint-Louis", n=24; "Grande-Côte", n=5; "Dakar", n=29; "Saloum", n=44; D: "Casamance", n=35). Different letter indicates significant difference between groups (B: KW test followed by Conover-Iman multiple comparison test with Bonferroni's adjustment method,  $p < 0.001$ ; C: ANOVA followed by Tukey's HSD test;  $p < 0.01$ ). .... 152
- Figure 28** Mercury (Hg) concentration (ppm dry weight) in muscles of fish species according to their proximity to the coast (A) and according to water column distribution (B) (Froese and Pauly, 2017). Different letter indicates significant difference between groups (ANOVA followed by Tukey's HSD test; A:  $p < 0.001$ , B:  $p < 0.01$ ). .... 154
- Figure 29** Schematic representation of major processes involved in Hg accumulation in marine fish species from the Senegalese coast. River inputs carry organic matter (OM) and particulate inorganic Hg to the coastal environment. After particles sinking, Hg is methylated by bacterial activity, becoming highly bioavailable for fish foraging near the sediments (*i.e.* demersal species and, to a lesser extent, benthopelagic species). Methylmercury (MeHg) is rapidly accumulated by the biota, and concentrations decrease away from the coast. MeHg is also supposed to be transported nearshore by a coastal current resulting from the upwelling activity. Near the surface, photochemical degradation of MeHg leads to formation of inorganic Hg which is poorly assimilated by pelagic fish. .... 155
- Figure 30** Mercury (Hg) concentration (ppm dry weight) in muscles of individual fish vs. muscle  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) signature from various sites (A: "Saint-Louis"; B: "Dakar"; C: "Saloum"; D: "Casamance"). Data fit a linear curve in A and B but not in C and D. "Grande Côte" station was not shown because only 5 individuals were sampled. .... 158
- Figure 31** Mercury (Hg) concentration (ppm dry weight) in muscles of individual fish vs. muscle  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) signature from "Saloum" station (A), from various sites (*i.e.* "Saint-Louis", "Grande Côte", "Dakar", "Casamance"; B) and from all confounded sites except red points from Saloum (C). Data fit a polynomial curve in A, while data fit a linear curve in B. The former is due to the low  $\delta^{13}\text{C}$  of the red-colored individuals despite their well known coastal ecology, suggesting influence of terrestrial input more than offshore  $\delta^{13}\text{C}$  signature. C: The two groups determined through k-means clustering on individual  $\delta^{13}\text{C}$  values explained 71.6 % of the observed variability and significantly differed in  $\delta^{13}\text{C}$  values (ANOVA,  $p < 0.001$ ). .... 159
- Figure 32** Mercury (Hg) concentration (ppm dry weight) in muscles of fish according to  $\delta^{13}\text{C}$  clustering. Group 1: offshore/pelagic vs. 2: inshore/demersal habits. Different letter indicates significant

difference between groups (KW test followed by Conover-Iman multiple comparison test with Bonferroni's adjustment method;  $p < 0.001$ )..... 160

**Figure 33** Schéma récapitulatif des 4 principaux paramètres étudiés, déterminant les concentrations métalliques chez les poissons marins. 1) Les cinétiques d'accumulation et d'élimination dans différents organes ; 2) la répartition subcellulaire des métaux ; 3) La composition des proies ; 4) L'occupation de l'habitat. Les flèches représentent les flux d'éléments métalliques entre les compartiments. .... 165

**Figure 34** Hypothèses générales concernant le rôle des différentes fractions cellulaires séquestrant les métaux chez les animaux, en termes d'accumulation (A), d'élimination (B), de sensibilité à la toxicité (C) et de transfert trophique (D). La taille des fractions correspond à la répartition du Cd généralement observée. En blanc : les hypothèses suggérées par les résultats des chapitres 1 et 2 des présents travaux. Adapté de la revue de Vijver et al. (2004)..... 167

**Figure 35** Signatures isotopiques (A) et niches trophiques spécifiques, correspondant à l'aire de l'ellipse standard corrigée pour les petits nombres d'échantillons (SEAc), calculée par approche bayésienne grâce au package SIBER (Stable Isotope Bayesian Ellipses in R) (Jackson et al., 2011). Les ellipses ont été établies à partir des signatures isotopiques des individus (B), mais également à partir de leurs coordonnées dans un espace bidimensionnel obtenu après analyse en composantes principales (ACP) à partir des compositions en acides gras (AG) (C) et des concentrations en métaux (D). Différentes lettres indiquent des différences significatives entre les valeurs de  $\delta^{13}\text{C}$  entre les espèces (ANOVA suivie d'un test HSD de Tukey ;  $p < 0,05$ ). Issu de ce travail de thèse. .... 175

**Figure 36** Compositions isotopiques de *Chloroscombrus chrysurus* (n = 10) échantillonnés en Casamance au cours de ce travail de thèse. Les couleurs indiquent deux groupes différenciés par leur concentrations en mercure dans le muscle (ppm) (ANOVA ;  $p < 0,001$ ). Les groupes présentent également différentes valeurs de  $\delta^{13}\text{C}$  (ANOVA ;  $p < 0,01$ ) et de  $\delta^{15}\text{N}$  (ANOVA ;  $p < 0,05$ ) dans le muscle. Issu de ce travail de thèse. .... 178

# Liste des tableaux

- Table 1 Concentrations maximales autorisées (mg·kg<sup>-1</sup> de poids frais) pour le Cd par l'Union Européenne dans la chair de différentes espèces de poissons marin (Commission regulation (UE), 2014) ..... 17
- Table 2 Concentration en cadmium (ng·g<sup>-1</sup> de poids sec) dans le muscle de trois espèces de petits poissons pélagiques. « Différence » indique la différences entre la valeur la plus haute et la plus basse pour une même espèce, « facteur » indique le rapport entre la valeur la plus haute et la plus basse pour une même espèce. De Masski et al. (*com. pers.*) ..... 18
- Table 3 Caractéristiques écologiques et sites de prélèvement des espèces étudiées. n = nombre d'individus ; NT = niveau trophique ; Stations = A : Saint- Louis, B : Grande-Côte, C : Hann, D : Saloum, E : Casamance ; P = nature des proies (1 : détritux + phytoplancton ; 2 : zooplancton + invertébrés ; 3 : invertébrés ; 4 : invertébrés + poissons ; 5 : poissons) ..... 37
- Table 4 Cf: Cd concentration in food (ppm dw); Length at T0; Weight at T0; FI: daily food intake (% body weight · day<sup>-1</sup>); HSI: hepatosomatic index (% body weight at T0); Cd body: daily Cd input per body weight (µg Cd · g body<sup>-1</sup> · day<sup>-1</sup>); Cd liver: daily Cd input per liver weight (µg Cd · g liver<sup>-1</sup> · day<sup>-1</sup>). ..... 59
- Table 5 Synthesis of the results obtained in the Sea bass and the Senegalese sole after exposition to two dietary Cd concentrations. "Accum" indicates a higher level of Cd in exposed fish than in controls for at least one sampling point. "Release" indicates a loss in hepatic Cd before a further increase during depuration period. "Elim" indicates a loss in hepatic Cd at the end of the depuration period. "Induction" indicates a de novo synthesis of metallothioneins (MT) due to Cd exposition. "K<sub>u</sub>" is the uptake rate in the liver. "Loss" represents the proportion of eliminated hepatic Cd at the end of the depuration period compared to T70 (mean ± standard deviation; %). Different letters indicate significant differences over experiments among exposed fish of a same species, "\*" indicates a significant difference between species within a same experiment (ANCOVA). "No" indicates no accumulation nor induction. .... 67
- Table 6 Review of Cd levels in the tissues of the sea bass *Dicentrarchus labrax* and the Senegalese sole *Solea senegalensis*. Concerning experimental studies, only those involving chronic dietary exposition were retained. Cd concentrations are expressed in ppm dry weight unless otherwise stated (ppm wet weight). As no previous study investigated Cd levels in bile of *D. labrax* and *S. senegalensis*, studies on other fish species are shown for comparison. .... 73
- Table 7 Total metal concentration (ppm dry weight, mean ± sd) and subcellular partitioning (% of the total metal contained in each fraction, mean ± sd) of metal elements after 60 days of Cd dietary exposition and after 60 days of depuration in the liver of the sea bass *Dicentrarchus labrax* and the senegalese sole *Solea senegalensis* for both conditions (exposed and control fish). Values are shown only for organelles, metal rich granules (MRG) and metallothionein like proteins (MTLP) fractions where metal repartition significantly differed between control and exposed fish (values in bold; ANOVA, p < 0.05). No difference between control and exposed fish was found in total metal concentration in the liver of both species, neither in metal repartition in cellular debris, mitochondria and heat denaturable proteins (HDP) fractions (see Supporting Information). .... 93
- Table 8 Subcellular partitioning (% of the total metal contained in each metal pool, mean ± sd) of metal elements after 60 days of Cd dietary exposition and after 60 days of depuration in the liver of the sea bass *Dicentrarchus labrax* and the senegalese sole *Solea senegalensis*. BAM: biologically active metal pool (*i.e.* sensitive fractions); BIM: biologically inactive metal pool (*i.e.* detoxifying fractions). Values in

**bold indicate significant difference between BAM and BIM (ANOVA,  $p < 0.001$ ). No difference between species was found for a same metal pool (BAM or BIM) and condition (Cd Exposition or Depuration). 98**

**Table 9 Length (mm), weight (g) and hepatosomatic index (HSI) (mean  $\pm$  sd) of the sea bass *Dicentrarchus labrax* and the senegalese sole *Solea senegalensis* after 60 days of Cd dietary exposition for both conditions (exposed and control fish). Values in bold indicate significant difference between control and exposed sole (ANOVA,  $p < 0.05$ ). No difference between conditions was found for length and HSI for a same species. .... 98**

**Table 10 Summary (mean  $\pm$  standard deviation) of the biological parameters of fish from Dakar and Casamance. TL: trophic level (Froese and Pauly, 2016); n: number of individuals; Total length in cm; Wet weight in g. .... 114**

**Table 11 Fatty acid composition (mean  $\pm$  SD, %) of liver tissue of the three groups derived from the result of a hierarchical cluster analysis (Ward's method) from Dakar (left panel) and Casamance (right panel). Only FAs accounting for  $\geq 0.5\%$  of total FA in at least one fish sample are shown. Different letters indicate significant differences between the groups (ANOVAs followed by Tukey's HSD tests or KW tests followed by multiple comparison tests). .... 122**

**Table 12 Correlations (40) between trace metals and tracers in Dakar. Only correlations with a coefficient  $> 0.5$  are shown. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . .... 125**

**Table 13 Correlations (28) between trace metals and tracers in Casamance. Only correlations with a coefficient  $> 0.5$  are shown. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . .... 126**

**Table 14 Dietary origin of the metal elements inferred by tracers (SI and FA) in the two locations. .... 135**

**Table 15 Summary (mean  $\pm$  standard deviation) of the different biological parameters measured on fish from different sampling sites. TL and habitat (Froese and Pauly, 2017) indicate respectively trophic level and water column distribution. "Shore" defines horizontal distribution of the species: "Off" includes bathydemersal and oceanodromous species while "In" includes coastal, brackish and estuarine species. "Group" is relative to k-means clustering of individuals based on  $\delta^{13}\text{C}$  values: "1" includes pelagic/offshore fish while "2" includes demersal/inshore individuals. .... 148**

**Table 16 Concentration moyenne (ppm de poids sec) en cadmium (Cd) dans le foie de différentes espèces pêchées à Dakar et en Casamance. n : nombre d'individus. Issu de ce travail de thèse. .... 170**

**Table 17 Chevauchement des niches isotopiques (i.e. pourcentage de l'aire la plus petite incluse dans l'aire la plus grande) entre les 6 espèces pêchées en Casamance, à partir des analyses d'isotopes stables (IS), d'acides gras (AG) et de métaux (ME). Ba : *Brachydeuterus auritus* ; Cc : *Chloroscombrus chrysurus* ; Cr : *Caranx rhonchus* ; Gd : *Galeoides decadactylus* ; Sd : *Selene dorsalis* ; Sg : *Sphyræna guachancho*). Issu de ce travail de thèse. .... 176**

# Liste des abréviations

ANOVA : analyse de la variance

ARA : acide arachidonique

CCLME : grand écosystème marin du courant des Canaries

Cd : cadmium

DHA : acide docosahexaénoïque

EPA : acide eicosapentaénoïque

FA / AG : acides gras

Hg : mercure

HDP : protéines sensibles à la chaleur

HSP : protéines résistantes à la chaleur

KW : Kruskal-Wallis

MeHg : méthylmercure

MUFA : acides gras monoinsaturés

MT : métallothionéines

MRG : granules riches en métaux

PCA : analyse en composante principale

PUFA : acides gras polyinsaturés

SI / IS : isotopes stables

SFA : acides gras saturés









# INTRODUCTION GENERALE



# 1. LE GRAND ECOSYSTEME MARIN DU COURANT DES CANARIES

---

## Spécificités environnementales

Le système du courant des Canaries se situe le long de la côte ouest de l'Afrique, depuis Gibraltar (36°N) jusqu'au Sud de la Guinée Bissau (10°N). Il s'étend sur plus de 5400 km de côte et couvre une surface en mer de 2 millions de km<sup>2</sup>, incluant les zones économiques exclusives de 7 pays (*i.e.* Espagne via les îles Canaries, Maroc, Mauritanie, Sénégal, Gambie et Guinée-Bissau) (Sambe et al., 2016). Cet écosystème est associé à un régime de courants particulier lié à la présence de phénomènes océanographiques appelés « upwellings ». Il fait partie des quatre plus grands systèmes d'upwelling au monde se situant sur les façades ouest des grands continents aux latitudes tropicales et subtropicales. Parmi ces upwellings de bord est, on retrouve dans le Pacifique le courant de Californie dans l'hémisphère nord (incluant les Etats-Unis et le Mexique) ainsi que le courant de Humboldt dans l'hémisphère sud (Pérou et Chili). En Atlantique nord se trouve le courant des Canaries et dans l'hémisphère sud le courant du Benguela (Angola, Namibie et Afrique du Sud). Un upwelling (de l'anglais up=montée et well=source) se caractérise par une remontée d'eau profonde sur le plateau continental qui compense la dérive des eaux de surface vers le large sous les actions combinées d'un vent favorable (vents parallèles à la côte et dirigés vers l'Équateur le long d'un upwelling de bord est) et de la rotation de la terre (l'action de la force de Coriolis sur les mouvements océaniques) (Figure 1).

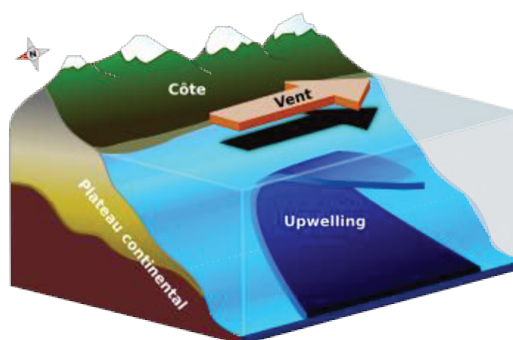


Figure 1 Représentation schématique du fonctionnement d'un système d'Upwelling ([www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)).

Les eaux froides remontant le long de ces côtes sont généralement riches en nutriments, en raison de leur enrichissement permanent par les fèces de zooplancton, poissons, invertébrés, de leurs carcasses qui coulent en se dégradant puis s'accumulent en profondeur, et de l'absence de production primaire en profondeur pour utiliser ces nutriments. Cet apport de nutriments dans la zone euphotique où se produit la photosynthèse a pour effet de stimuler la croissance du phytoplancton. Cette forte production primaire soutient à son tour le développement de l'ensemble du réseau trophique faisant de ces écosystèmes marins les plus productifs en biomasse. Parmi eux, le courant des Canaries se place au premier rang en termes de production primaire (« PP », histogramme bleu sur la Figure 2), estimée à 372 grammes de cellules par mètre carré et par an (Sambe et al., 2016), grâce à un important apport en nitrate (« NP », histogramme vert sur la Figure 2) par les eaux issues de l'upwelling, doublé d'un dépôt de Fer provenant des poussières sahariennes (Chavez et Messié, 2009; Messié et Chavez, 2015).

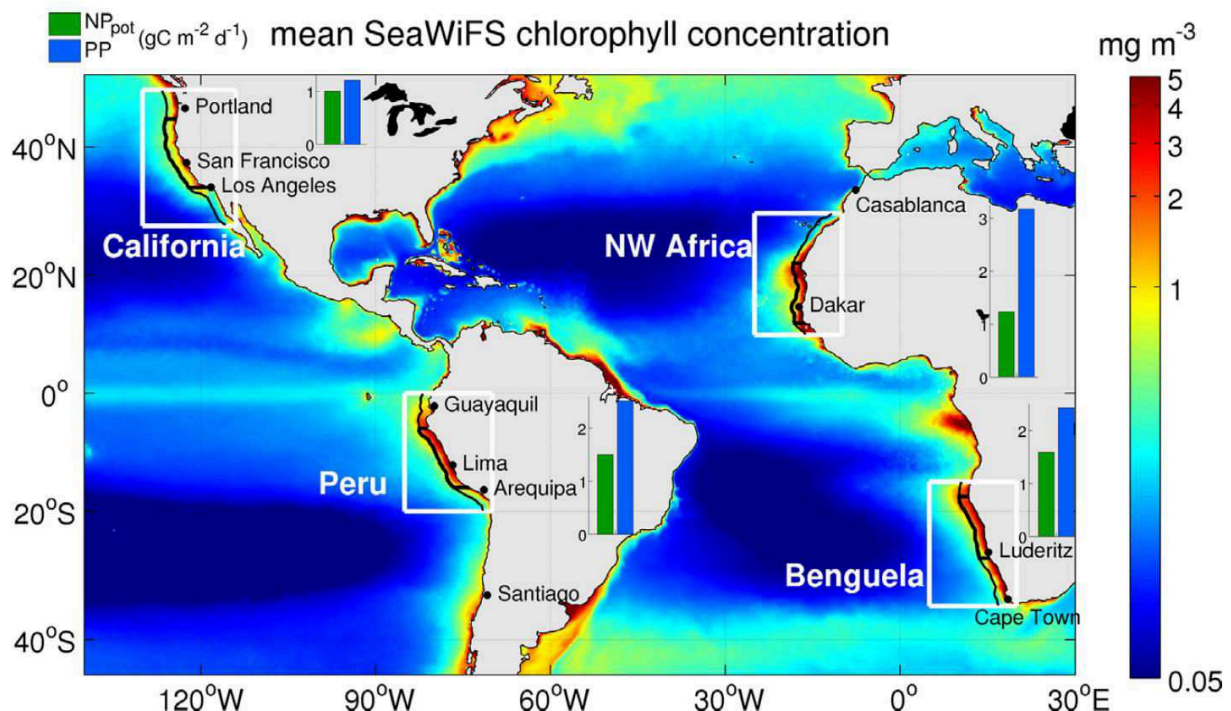


Figure 2 Les quatre principaux systèmes d'upwelling de bord est. Le gradient de couleur représente la concentration en chlorophylle ( $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$ ). L'histogramme « NP » représente les apports journaliers en nitrate liés à l'upwelling, et « PP » indique la production primaire journalière moyenne ( $\text{gC}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ ). D'après Messié et Chavez 2015.

L'upwelling n'est cependant pas homogène au sein du courant des Canaries. La localisation et la saisonnalité des résurgences sont contrôlées par la topographie et le régime des vents, issu du balancement de l'anticyclone des Açores et de la migration de la zone de convergence intertropicale. Cette complexité donne lieu à une zone d'upwelling permanent ainsi qu'à des zones d'upwelling saisonnier (Figure 3). Au nord du Maroc, l'upwelling débute en mars pour se terminer en août, alors qu'il a lieu toute l'année du Sahara Occidental jusqu'au nord de la Mauritanie. Du Sud de la Mauritanie au nord du Sénégal, l'upwelling est actif d'octobre à juin, et seulement de décembre à mai pour la partie sud du Sénégal.

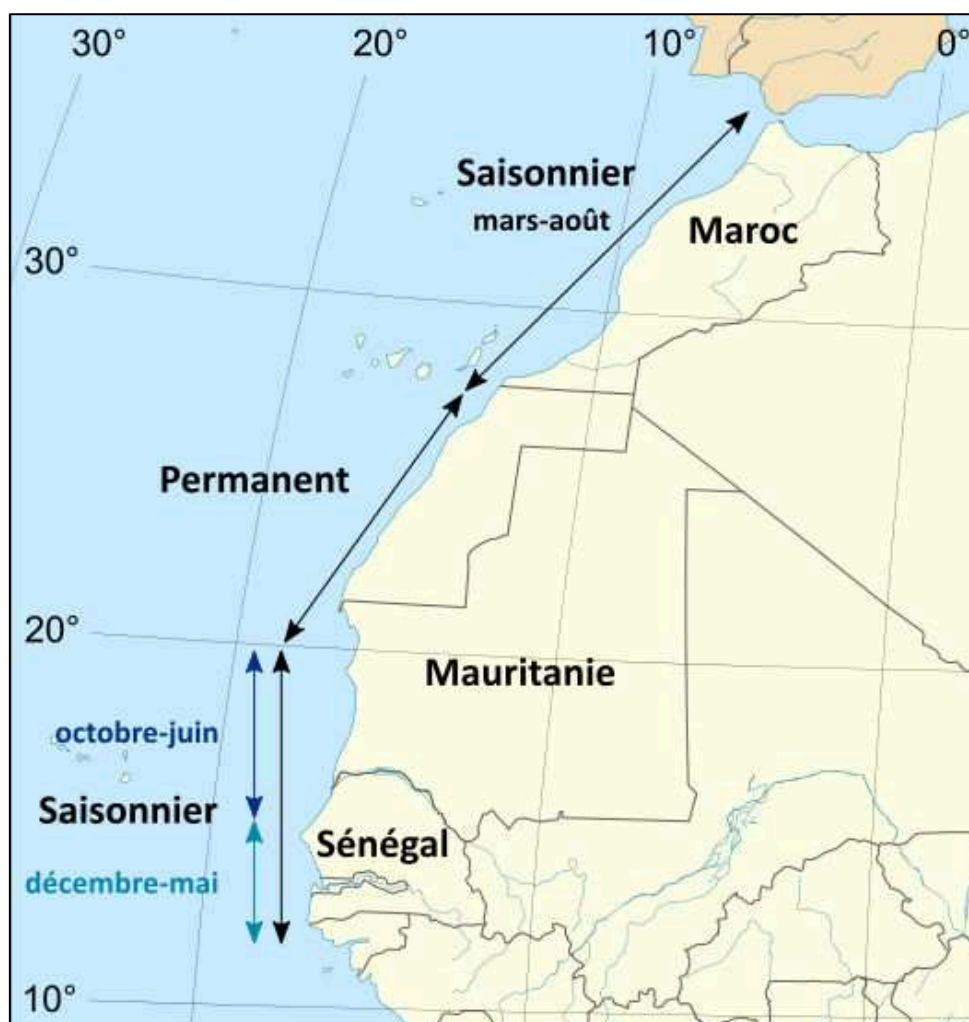


Figure 3 Localisation des centres d'upwelling et leur saisonnalité dans le système de courant des Canaries. Adapté de Taleb (2005).



A plus fine échelle, le vent s'intensifie généralement au niveau des caps importants, induisant des résurgences locales particulièrement actives comme par exemple au Cap Blanc à la frontière entre le Maroc et la Mauritanie ainsi qu'au niveau de la presqu'île de Cap Vert à Dakar (Sénégal). Enfin, cette variabilité de l'activité de l'upwelling dans le courant des Canaries induit de forts écarts de températures de surface de l'ordre de 12°C (Rebert, 1982). En effet, alors que l'eau ne dépasse pas 16 à 18°C en février-mars, les températures atteignent 28 à 30°C en août et septembre le long des côtes mauritaniennes et sénégalaises.

## Contexte halieutique

Bien que ne représentant qu'un pour mille de la surface des océans, les zones d'upwelling sont les plus exploitées par l'Homme et produisent près d'un cinquième des captures marines mondiales (Fréon et al., 2009). Parmi les nombreux services rendus par l'écosystème du courant des Canaries, estimés à environ 11,7 milliards de dollars US (Interwies et Görlitz, 2013), les ressources halieutiques représentent une large part, faisant du courant des Canaries (CCLME) la première zone de pêche du continent africain. En effet, parmi les 12 500 espèces marines recensées au sein de cet écosystème, certaines font l'objet d'une exploitation importante par les pêcheries locales. La production halieutique de cet écosystème est effectuée à environ 70 % par la pêche côtière et artisanale et dépasse les 3 millions de tonnes par an ([www.fao.org/fishery](http://www.fao.org/fishery), 2015). Elle est à une large majorité composée de petits poissons pélagiques, parmi lesquels la sardine commune *Sardina pilchardus* représente l'espèce dominante, constituant plus de 30 % des captures annuelles sur la période 2000-2010 (Figure 4). Cette espèce est suivie par les sardinelles *Sardinella sp.* (22 % des captures) et les chinchards *Trachurus sp.* (16 %), ainsi que d'autres espèces telles que le maquereau espagnol *Scomber japonicus*.

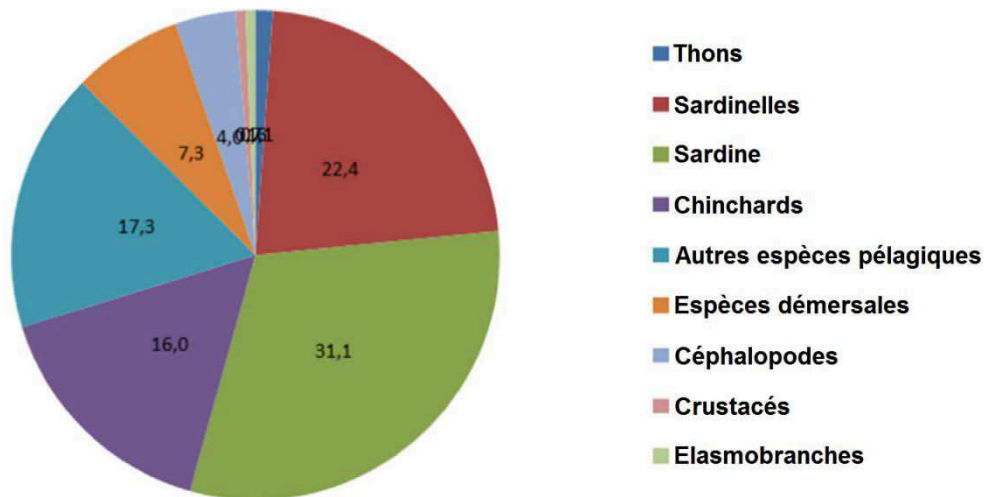


Figure 4 Contribution moyenne (%) de différents groupes aux captures annuelles réalisées entre 2000 et 2010 sur l'ensemble de la zone de pêche du CCLME ([www.fao.org/fishery](http://www.fao.org/fishery), 2015).

L'écosystème du courant des Canaries garantit ainsi l'approvisionnement en produits marins des populations locales mais également européennes, puisque près de la moitié de la production halieutique est destinée à l'exportation, parmi laquelle environ 40 % sont dédiés à l'Union Européenne (MAPM, 2015).

## 2. LA CONTAMINATION METALLIQUE

---

Les écosystèmes côtiers constituent une zone d'interface entre le continent, l'atmosphère et l'océan, et représentent 7 % (26.106 km<sup>2</sup>) de la surface totale des océans. L'Organisation des Nations Unies pour l'Education, la Science et la Culture (UNESCO) estime à environ 3,4 milliards la population humaine vivant sur une côte ou à moins de 200 km d'un littoral ce qui représente la moitié de la population actuelle du globe. Alors que 40 % de la population mondiale vit actuellement dans la bande des 100 km, cette part devrait atteindre 75 % en 2025, soit 6,3 milliards d'êtres humains. De par cette forte pression démographique, les écosystèmes côtiers sont soumis à de nombreuses perturbations d'origine anthropique.

En Afrique de l'ouest, les problèmes environnementaux prioritaires établis par le Programme des Nations Unies pour l'Environnement (UNEP) concernent : l'épuisement des ressources

halieutiques et la perte de biodiversité marine ; la dégradation et la modification de l'habitat ; le déclin de la qualité de l'eau lié aux activités terrestres humaines tels que les rejets d'effluents liés aux activités industrielles et urbaines ainsi qu'au lessivage des terrains agricoles (UNEP, 2006). Avec une population estimée à 64,5 millions de personnes tous pays confondus, l'écosystème côtier du courant des Canaries est lui aussi soumis à une pression anthropique responsable de pollutions locales.

## Sources

Parmi les différents contaminants responsables de cette pollution, certains éléments métalliques occupent une place prépondérante et trouvent tout d'abord leur origine dans le secteur de l'industrie. A titre d'exemple, le Maroc est le premier producteur et exportateur mondial de produits phosphatés toutes formes confondues, abritant 73 % des réserves mondiales de phosphate connues à ce jour (OCP, 2015). Les minerais phosphatés renferment naturellement une quantité importante d'éléments toxiques comme le cadmium (Cd), pour lequel les concentrations vont de 24 à 96 ppm (parties par million =  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) dans les minerais marocains et de 225 à 290 ppm au Sénégal, également producteur d'engrais (Friberg et al., 1985). La fabrication d'acide phosphorique et d'engrais phosphatés entraîne de plus la création d'un sous-produit, le phosphogypse, qui est relargué sans traitement dans l'environnement marin (Cheggour et al., 1999; Gaudry et al., 2007; Kaimoussi et al., 2001). Le phosphogypse est également connu pour concentrer du Cd mais également de l'uranium tout comme les engrais phosphatés (Rutherford et al., 1994; Schipper et al., 2011; Smidt et al., 2011), et son rejet serait à l'origine d'un enrichissement du milieu marin équivalent à 240 tonnes de Cd par an (Auger et al., 2015). L'industrie du phosphate représente donc une source majeure d'apports anthropiques en métaux dans le courant des Canaries, soit par rejet direct de phosphogypse, soit indirectement par l'utilisation d'engrais qui contaminent l'environnement marin via le lessivage des terrains cultivés.

Le rejet des eaux usées est également une cause de contamination importante en métaux toxiques. Au Sénégal, la ville de Dakar héberge à elle seule près d'un quart de la population du pays et ne dispose que d'une seule station d'épuration (Diop et al., 2012). Ce réseau d'assainissement limité conduit à un déversement direct ou par ruissellement d'eaux non

traitées dans l'environnement marin. En effet, sur plus de 67 millions de m<sup>3</sup> d'eaux usées rejetées chaque année dans la région dakaroise, moins de 60 % font l'objet d'un traitement. Cela conduit à une forte pollution des eaux et sédiments de surface par des éléments tels que le cadmium, le chrome et le plomb, constatée à proximité des métropoles telles que Casablanca au Maroc ou Saint-Louis et Dakar au Sénégal (Benbrahim et al., 2006; Diop et al., 2015, 2014).

Enfin, l'activité de l'upwelling influence grandement le cycle des éléments métalliques au sein de l'écosystème marin du courant des Canaries. En effet, suivant le cycle des nutriments, les métaux toxiques sont assimilés par les organismes marins et finissent par rejoindre le pool de matière organique détritique coulant en profondeur, avant d'être reminéralisés par des bactéries hétérotrophes pour être finalement à nouveau transportés vers la surface via la remontée d'eaux profondes induite par l'upwelling. Pour des éléments comme le Cd, les plus fortes concentrations naturelles observées dans l'océan correspondent aux zones d'upwelling prononcé (Mart et Nürnberg, 1986). La mesure de cet élément peut ainsi permettre de retracer la présence et l'intensité d'une zone d'upwelling actuelle via la mesure du Cd dissous dans l'eau (Takesue et van Geen, 2002), ou passée via l'analyse de pièces carbonatées fossiles (van Geen et Husby, 1996). Il en va de même pour le courant des Canaries, où les concentrations en Cd hors zones de rejets industriels suivent l'intensité et la saisonnalité de l'activité de l'upwelling (Benbrahim et al., 2006; Hakima et al., 2017; Maanan, 2008). Il a ainsi été estimé que la contribution de l'upwelling dans l'assimilation du Cd par le phytoplancton égalait (Auger et al., 2015) ou dépassait (Waeles et al., 2016) celle des apports anthropiques.

## **Spéciation des métaux**

Dans l'environnement marin, les éléments métalliques peuvent se présenter sous trois formes discriminées en fonction de leur taille : dissoute (< 1 nm), colloïdale (1 nm à 0,4 µm) et particulaire (> 0,4 µm) (Chiffoleau et al., 1999). La spéciation des éléments métalliques est régie par différents facteurs physicochimiques et biologiques variant entre ces trois formes, tels que le pH, la salinité, la concentration en matière en suspension et la nature géochimique des particules. Les formes dissoutes comprennent des ions sous forme libre ou

complexés à des composés minéraux tels que des chlorures, ou organiques tels que des acides aminés, des composés de type EDTA (Éthylène Diamine Tétra-Acétique) ou des métabolites excrétés par le phytoplancton. Les formes colloïdales sont quant à elles issues de la liaison des métaux avec des molécules de haut poids moléculaire tels que les acides humiques, lipides et polysaccharides. Enfin, les formes particulières résultent d'une association avec une phase solide d'origine minérale, comme par exemple précipité avec du phosphate, ou d'origine organique comme inclus dans des carbonates, des restes d'organismes ou encore des pelotes fécales (Sadiq, 1989).

## **Toxicité des métaux**

Au sein du large panel d'éléments métalliques présents en quantité significative dans les écosystèmes marins, tous n'ont pas les mêmes effets sur les organismes. En effet, certains métaux appelés « oligo-éléments » sont indispensables au fonctionnement des processus biologiques, mais peuvent toutefois s'avérer toxiques à fortes concentrations, tel le cuivre, le fer ou le zinc. D'autres n'ont pas de rôle biologique démontré et présentent une toxicité pour les organismes même à de faibles concentrations, comme le cadmium, le mercure et le plomb. Chez les organismes marins comme les poissons, la toxicité de ces éléments est ainsi responsable de nombreux dommages. Le cadmium (Cd) est par exemple connu pour augmenter le stress oxydant, induire des perturbations endocriniennes et de l'homéostasie des métaux essentiels, provoquer des pathologies tissulaires et une dépression du système immunitaire qui affectent *in fine* la croissance et la survie (McGeer et al., 2011a). Ces éléments peuvent également impacter la santé humaine par entre autres leurs propriétés cancérigènes, neurotoxiques et reprotoxiques (Bosch et al., 2016). Au Japon, deux cas d'intoxication historiques ont impliqué le cadmium et le mercure. De 1910 à 1945, des rejets industriels de cadmium dans la préfecture de Toyama ont provoqué l'intoxication de plusieurs centaines de personnes via la consommation de riz contaminé. La maladie qui en a découlé a été nommée « Itai-Itai », littéralement « aïe-aïe », en référence aux fortes douleurs qu'elle provoque, dues aux atteintes osseuses induites par substitution du calcium par le cadmium en plus d'une sévère insuffisance rénale (Inaba et al., 2005). En ce qui concerne le mercure, son rejet également industriel d'environ 400 tonnes de 1932 à 1966

dans la baie de Minamata causa l'intoxication de plusieurs dizaines de milliers de personnes via la consommation de poisson. Cette pollution induisit notamment une contamination *in utero* qui engendra des symptômes se traduisant par des atteintes physiques et neurologiques graves et permanentes chez les nouveau-nés (Harada, 1995).

Ces éléments toxiques ont longtemps été étudiés sous la dénomination de « métaux lourds » de par leur importante masse volumique. Ce terme est cependant peu pertinent d'un point de vue chimique car il englobe des éléments plus légers tels que des métalloïdes pourtant hautement toxiques comme l'arsenic. L'Union Européenne a cependant adopté cette appellation qui vaut pour le droit européen et celui des États-membres et définit « les matériaux sous forme métallique, pour autant qu'ils soient classés comme substances dangereuses » (UE, 2000). La notion d'« éléments traces métalliques » (ETM) s'est également récemment répandue dans la littérature, caractérisant les métaux dont la concentration naturelle moyenne dans la croûte continentale supérieure est inférieure à 1000 ppm ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ). Cette classification va cependant à l'encontre de l'abondance crustale de certains éléments comme le fer qui peuvent induire une toxicité à forte dose. De plus, le qualificatif de « traces » peut s'avérer trompeur dans le contexte d'importants niveaux de contamination retrouvés dans certains environnements. Bien que naturellement présents dans les roches et la croûte terrestre et libérés dans l'atmosphère et l'hydrosphère par certains processus tels que l'activité volcanique ou l'érosion, l'émission naturelle de métaux toxiques est en général faible comparée aux sources anthropiques. En effet, 15 % du Cd et seulement 4 % du plomb atmosphérique proviennent de sources naturelles (Nriagu, 1989). Bien que les activités humaines ne créent pas les éléments métalliques, elles participent largement à leur diffusion et leur concentration.

### **3. LA BIOACCUMULATION DES METAUX PAR LES ORGANISMES MARINS**

---

En conséquence des apports métalliques vers l'écosystème côtier du courant des Canaries, une accumulation de métaux non-essentiels comme le Cd est observée chez des organismes de niveaux trophiques et d'habitats différents. En milieu pélagique, l'accumulation de Cd a

été montrée du plancton (Auger et al., 2015; Waeles et al., 2016) aux poissons pélagiques (Chahid et al., 2014; Diop et al., 2016a; Roméo et al., 1999), tout comme en milieu côtier où ce métal est retrouvé dans les macroalgues (Diop et al., 2016b; Gaudry et al., 2007), les invertébrés benthiques (Cheggour et al., 1999; Kaimoussi et al., 2001; Maanan, 2008; Roméo et Gnassia-Barelli, 1988; Sidoumou et al., 1999, 2006) et les poissons démersaux (Diop et al., 2016a, 2016b; Roméo et al., 1999; Sidoumou et al., 2005). Cette accumulation résulte de divers processus biologiques, donnant lieu à des concentrations métalliques significatives pouvant être observées chez certains poissons de cet écosystème.

## Voies d'assimilation

Les organismes marins peuvent assimiler les métaux présents dans l'environnement d'abord par voie directe, par transport à travers les membranes biologiques des organes à l'interface avec l'eau, tels que les branchies et dans une moindre mesure le tégument et le tractus digestif. La spéciation des métaux revêt alors une importance particulière, puisque les formes colloïdales et particulaires ne sont que peu assimilables par voie directe (Hollis et al., 1996). D'autre part, les consommateurs marins assimilent également les métaux par voie trophique, via l'ingestion de proies contaminées. La part relative des apports issus de ces deux voies, directe ou trophique, dans la contamination métallique des poissons ne fait pas l'objet d'un consensus dans la littérature, mais il semblerait que les apports trophiques soient prédominants en milieu marin (Mathews et Fisher, 2009a). En effet, Creighton et Twining en 2010 ont montré chez un poisson estuarien (*Ambassis jacksoniensis*) que près de la totalité des métaux étaient assimilés par voie trophique (*i.e.* 97 % pour le Cd, 99 % pour le sélénium et 98 % pour le zinc). Le transfert trophique serait d'ailleurs d'autant plus important pour des poissons prédateurs que pour des espèces omnivores, comme montré par exemple pour l'accumulation du césium chez le sébaste *Sebastes marmoratus* (Pan et Wang, 2016). Ce constat peut d'abord être lié à la plus grande dilution des métaux en milieu marin comparé aux milieux dulcicoles. Par exemple, les concentrations en Cd mesurées en 2014 dans l'eau de mer au large du Maroc par la campagne EPURE (« Eléments traces métalliques, pollution, upwelling et ressources ») ne dépassaient pas 45 ng.L<sup>-1</sup> alors qu'elles peuvent atteindre 250 ng/L dans l'estuaire de la Gironde (Boutier et al., 1989). De plus, en

milieu aquatique certains éléments comme le mercure sous sa forme méthylée présentent une forte affinité biologique et sont rapidement assimilés par le phytoplancton (Mason et al., 1996) avant d'être transférés et bioamplifiés via la chaîne trophique jusqu'aux poissons.

## **Transport et séquestration des métaux**

Après ingestion, les éléments toxiques tels que le Cd sont transportés et distribués dans l'organisme en empruntant les voies dédiées aux métaux essentiels. Plusieurs voies d'entrées ont ainsi été identifiées chez les poissons le long du tractus gastrointestinal. Parmi elles, on notera principalement l'utilisation des canaux calciques, ou des protéines de transport membranaire telles que le DMT1 (divalent metal transporter 1) ou les transporteurs ZIP (zinc/iron permease) (McGeer et al., 2011a). D'autre part, des transporteurs d'acides aminés (AA) ou de petits peptides peuvent également participer à l'absorption des métaux, lorsqu'ils sont conjugués à des cystéines libres ou sous forme d'oligopeptides (*i.e.* peptides constitués d'un faible nombre d'AA). Une fois dans la circulation sanguine, les métaux sont principalement transportés par des protéines plasmatiques telles que l'albumine, la transferrine et dans une moindre mesure les métallothionéines. Le foie sera le premier organe à recevoir les métaux après internalisation ce qui lui confère un rôle primordial dans la bioaccumulation. L'entrée dans les hépatocytes se fera également via les mêmes transporteurs que pour la barrière intestinale (*i.e.* canaux calciques, protéines de transport des métaux, transporteurs d'AA et de peptides), où les métaux non-essentiels pourront se fixer à de nombreux ligands cellulaires (ADN, ARN, protéines, granules, organites, etc), restant sous une forme ionique ce qui induira une toxicité, ou étant séquestrés sous formes non-ioniques ce qui limitera leur toxicité (Campbell et al., 2008; Eyckmans et al., 2012; Giguere et al., 2006). Parmi les ligands inhibant cette toxicité, l'un des mécanismes les plus étudiés à ce jour concerne la séquestration des métaux par des protéines de faible poids moléculaire, les métallothionéines (MT). Leurs propriétés et rôle biologique seront développés plus en détail dans la partie II consacrée à la méthodologie. A l'instar des MT, qui sont caractérisées par une forte teneur en acides aminés soufrés (cystéines), tous les ligands cellulaires présentant un groupement thiol tel que le glutathion peuvent séquestrer les métaux. Il en est de même pour les molécules



riches en fonctions carboxyliques. Le deuxième mécanisme le plus impliqué dans la détoxification des métaux serait leur précipitation au sein de concrétions inorganiques insolubles appelées « granules riches en métaux », constitués d'un assemblage de minéraux tels que des phosphates de calcium et de magnésium (George et al., 1980). MT et granules sont ainsi responsables de la séquestration de plus de la moitié du nickel et du thalium accumulés dans le corps entier du têtard de boule *Pimephales promelas* à partir de deux types de proies différents (Lapointe et al., 2009a). De même, la fraction de protéines cytosoliques contenant les MT constitue un moyen de détoxification important pour les anguilles aussi bien américaines (*Anguilla rostrata*) qu'euroennes (*Anguilla anguilla*) face à une exposition croissante à de nombreux métaux (argent, arsenic, cadmium, nickel, plomb, thalium), séquestrant jusqu'à 76 % du Cd présent dans le foie. Ce mécanisme de détoxification est de plus secondé par les granules pour certains éléments (nickel, plomb, thalium) chez les deux espèces (Rosabal et al., 2015). Une fois complexés aux ligands cellulaires, les métaux seront soit stockés, soit dirigés vers la membrane baso-latérale pour être excrétés via la bile (Hauser-Davis et al., 2012a, 2014a; Westerlund et al., 1998) ou libérés dans le système circulatoire avant d'atteindre d'autres organes d'accumulation secondaire tels que le muscle ou d'élimination tels que les reins (Berntssen et al., 2001; Kim et al., 2006; Siscar et al., 2014).

## **Transfert trophique**

Dans le cas des métaux non-essentiels, dont la concentration n'est pas régulée par le métabolisme, leur faible excrétion induit un phénomène d'accumulation par les organismes appelé « bioaccumulation ». Bien que transférés des proies vers les prédateurs, la bioamplification des métaux, correspondant à leur augmentation avec celle de la position dans la chaîne alimentaire, n'est que rarement observée à l'exception du césium (Cs) et du méthylmercure (MeHg) (Mathews et al., 2008; Mathews et Fisher, 2008; Pethybridge et al., 2012). En effet, l'assimilation trophique du Cs et du MeHg par les poissons prédateurs peut atteindre les 95 % en fonction du type de proies (Wang et Wong, 2003; Zhao et al., 2001), ce qui, ajoutée à sa faible élimination, explique son amplification à travers la chaîne trophique. A l'inverse, pour la plupart des métaux, les concentrations n'augmentent pas de façon

linéaire avec le niveau trophique des organismes, s'expliquant en partie par la forte variabilité observée entre espèces dans l'efficacité d'assimilation de ces éléments. En effet, la proportion de métal traversant la barrière intestinale après ingestion dépend fortement des caractéristiques du consommateur, mais également de la nature des proies et de l'élément considéré (voir section suivante).

## 4. VARIABILITE INTER ET INTRASPECIFIQUE

---

### Observations expérimentales

De nombreuses études expérimentales ont analysé l'accumulation chronique des métaux (*i.e.* sur plusieurs mois) chez certaines espèces de poissons marins après exposition par voie trophique (Berntssen et al., 2001; Kim et al., 2006; Odzak et Zvonaric, 1995; Okorie et al., 2014; Ruangsomboon et Wongrat, 2006), mais très peu d'entre elles n'ont encore impliqué plusieurs espèces soumises simultanément aux mêmes conditions d'exposition. De telles comparaisons d'espèces existent dans la littérature mais elles s'attardent en général d'avantage sur le suivi de l'élimination des métaux après ingestion d'une unique dose d'éléments radioactifs (Mathews et al., 2008; Pouil et al., 2017). Toutefois, Zhang et al. (2016) ont récemment montré une accumulation de l'arsenic (As) contrastée entre *Siganus fuscescens* et le bar du Japon *Lateolabrax japonicus*. En effet, après 28 jours d'exposition à un aliment artificiel enrichi en As, le bar montrait une augmentation de la concentration en As dans différents organes (intestin, foie, muscle) par rapport aux témoins, contrairement à *S. fuscescens* qui ne présentait pas d'accumulation significative (Zhang et al., 2016). Cette variabilité interspécifique a de plus été retrouvée après exposition par voie directe. Jeffree et al. (2006) montrent par exemple dans le cadre d'une contamination polymétallique dans l'eau par des radioisotopes, que la petite roussette *Scyliorhinus canicula* accumule d'avantage la majorité des métaux étudiés (Cd, Co, Mn, Zn, ou Am) que le turbot *Psetta maxima*. Enfin, même si le mode d'administration ne simule aucune réalité environnementale, une accumulation supérieure du Cd a été observée dans le foie de la

daurade royale *Sparus aurata* comparé à la sole sénégalaise *Solea senegalensis*, 6 jours après injection intrapéritonéale (Kalman et al., 2010).

## Observations en milieu naturel

Au sein des communautés de poissons du courant des Canaries, on retrouve également la forte variabilité interspécifique observée en conditions expérimentales en termes d'accumulation des métaux. Ainsi, il a été montré pour des poissons pêchés le long de la côte du Sénégal, que la sardinelle *Sardinella aurita* était bien plus contaminée en Cd (jusqu'à 38,4 ppm en moyenne dans le foie pour un des sites) que la sole sénégalaise *Solea senegalensis* (ne dépassant pas 1,57 ppm en moyenne pour le même site) (Diop et al., 2016a). Cet écart d'accumulation marqué entre les deux espèces peut en partie s'expliquer par des différences d'habitat, la sardinelle étant un poisson pélagique et la sole un poisson benthique. Toutefois, des différences d'accumulation marquées ont également été observées pour des espèces provenant du même habitat et à l'écologie proche. Ainsi, trois espèces de petits poissons pélagiques comptant parmi les plus exploitées par les pêcheries locales ont été échantillonnées durant la campagne EPURE en 2014 au large du Maroc. Les concentrations en Cd mesurées dans le foie ont permis de montrer une accumulation supérieure chez le maquereau espagnol *Scomber japonicus*, équivalente à 218,6 ng·g<sup>-1</sup> (ppb), comparé à la sardine commune *Sardina pilchardus* (54, 0 ppb) et au chinchard noir *Trachurus trecae* (74,8 ppb) (Masski et al., *com. pers.*) (Figure 5).

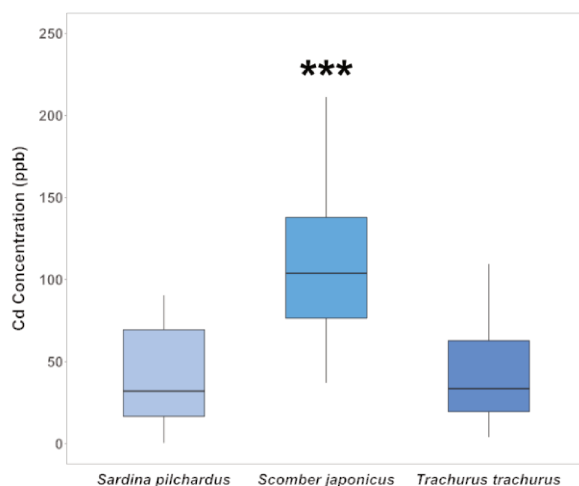


Figure 5 Concentration en cadmium (ng·g<sup>-1</sup> de poids sec) dans le muscle de trois espèces de petits poissons pélagiques échantillonnées durant la campagne EPURE au large du Maroc. Le maquereau espagnol *Scomber japonicus* (n=38) présente une concentration en Cd plus élevée (ANOVA suivie d'un test de comparaisons multiples de Tukey ; p<0,001) que la sardine commune *Sardina pilchardus* (n=31) et que le chinchard noir *Trachurus trachurus* (n=31). De Masski et al. (*com. pers.*).

De plus, au regard de la toxicité de certains métaux, des normes sanitaires concernant l'ingestion de certains métaux ont ainsi été mises en place par différentes instances telles que la Commission de Régulation de l'Union Européenne ou le Comité d'experts FAO/OMS sur les additifs alimentaires (JECFA). Ces normes incluent des concentrations maximales admissibles dans les chairs de poissons pour différents éléments toxiques tels que le cadmium, le mercure ou le plomb. Ces valeurs sont cependant dépendantes de l'espèce considérée (voir l'exemple du Cd, Tableau 1), reflétant d'avantage la variabilité des concentrations retrouvées entre les espèces exploitées plutôt que d'éventuelles différences de toxicité du métal pour l'Homme en fonction du type de poisson consommé. En effet, l'ingestion hebdomadaire tolérable est fixée à  $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  de masse corporelle pour le Cd et  $1,6 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  de masse corporelle pour le méthylmercure (JECFA (FAO/OMS), 2007), quelle que soit la source de métal (i.e. toutes espèces de poissons consommés confondus).

Espèces	Cd ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de poids frais)
Maquereaux ( <i>Scomber sp.</i> )	0,1
Thons ( <i>Thunnus sp.</i> , <i>Katsuwonus pelamis</i> , <i>Euthynnus sp.</i> )	0,1
Bichique ( <i>Sicyopterus lagocephalus</i> )	0,1
Bonitou ( <i>Auxis sp.</i> )	0,15
Anchois ( <i>Eugralis sp.</i> )	0,25
Espadon ( <i>Xiphias gladius</i> )	0,25
Sardine ( <i>Sardina pilchardus</i> )	0,25
Autres	0,05

**Tableau 1 Concentrations maximales autorisées ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de poids frais) pour le Cd par l'Union Européenne dans la chair de différentes espèces de poissons marin (Commission regulation (UE), 2014)**

Au-delà du paradoxe que constituent ces normes, largement basées sur des considérations économiques, celles-ci reflètent à nouveau la diversité des concentrations métalliques retrouvées chez les espèces marines de poissons.

Enfin, si la bioaccumulation des métaux par les poissons marins est fortement dépendante de l'espèce considérée, elle est aussi largement variable entre individus d'une même espèce. En effet, pour les mêmes espèces étudiées, la concentration en Cd dans le muscle peut évoluer d'un facteur supérieur à 600 à l'échelle d'une trentaine d'individus dans le cas de la sardine, et représenter une différence de plus d' $1 \mu\text{g g}^{-1}$  de poids sec entre l'individu le plus

et le moins contaminé dans le cas de maquereau espagnol (Masski et al., *com. pers.*) (Table X).

Nom commun	Nom scientifique	n	Moyenne	Minimum	Maximum	Différence	Facteur
Sardine commune	<i>Sardina pilchardus</i>	31	54,0	0,5	332,9	332,4	666
Maquereau espagnol	<i>Scomber japonicus</i>	38	218,6	37,2	1387,6	1350,4	37
Chinchard noir	<i>Trachurus trachurus</i>	31	74,8	4,1	769,9	765,8	190

Tableau 2 Concentration en cadmium ( $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  de poids sec) dans le muscle de trois espèces de petits poissons pélagiques. « Différence » indique la différences entre la valeur la plus haute et la plus basse pour une même espèce, « facteur » indique le rapport entre la valeur la plus haute et la plus basse pour une même espèce. De Masski et al. (*com. pers.*).

## 5. PARAMETRES DETERMINANT LA BIOACCUMULATION

---

La concentration métallique observée dans un organisme correspond à la différence entre la quantité de métal assimilée (directement ou par ingestion) et celle qui est éliminée par excrétion. Ainsi, de nombreux paramètres, aussi bien biotiques qu'abiotiques, peuvent influencer sur la bioaccumulation des métaux par les espèces marines et notamment les poissons.

Tout d'abord, la bioaccumulation dépend de la dose d'exposition, et donc de la concentration en métal dans le milieu abiotique (i.e. l'eau de mer), mais surtout biotique (i.e. la nourriture) dans le cas des poissons marins. En effet, il a été montré lors d'études expérimentales que la concentration de Cd accumulé dans différents tissus (i.e. intestin, foie, muscle, reins) augmentait proportionnellement à la dose présente dans l'aliment d'espèces telles que le saumon atlantique *Salmo salar* ou le sébaste *Sebastes schlegeli* (Berntssen et al., 2001; Kim et al., 2006).

### Paramètres physiologiques

La quantité de métal entrant dans l'organisme va ensuite être dictée par l'efficacité d'assimilation (EA). Comme évoqué précédemment, cette dernière est tout d'abord

dépendante de la spéciation des métaux (i.e. leur forme physico-chimique) mais aussi des processus impliqués dans le passage des métaux du milieu extérieur ou de la lumière intestinale vers le milieu interne (i.e. le système sanguin). Peu d'études ont comparé l'EA de différentes espèces de poissons marins placés dans les mêmes conditions expérimentales, et celles qui l'ont fait ont obtenus des résultats contradictoires. En effet, (Mathews et al., 2008) n'ont pas trouvé de différences majeures dans l'assimilation de plusieurs éléments incluant le Cd entre trois espèces différentes constituées de deux téléostéens (le turbot *Psetta maxima* et la daurade royale *Sparus aurata*) et un chondrichthyen (la petite roussette *Scyliorhinus canicula*) nourris avec des juvéniles de daurades marqués par éléments radioactifs. De plus, même s'ils n'ont pas été alimentés avec les mêmes proies, des EA similaires ont été retrouvées chez la daurade et le bar européen *Dicentrarchus labrax* (à savoir environ 21 et 23 % pour le Cd respectivement ; Mathews et Fisher, 2008). D'autre part, après avoir été nourris par les mêmes larves d'*Artemia salina*, *Ambassis urotaenia* présentait une assimilation du Cd presque deux fois plus élevée que le gobie *Periophthalmus cantonensis* (Ni et al., 2000). Ces observations contrastées peuvent premièrement s'expliquer par les différents types de proies utilisées. En effet, Ni et al. (2000) ont obtenu une assimilation similaire entre les deux mêmes espèces de poissons en utilisant une autre proie qu'*Artemia* (à savoir un copépode). Cette variabilité de l'EA en fonction de la composition de la nourriture a également été observée chez de nombreuses autres espèces de poissons marins (Pouil et al., 2016; Wang et al., 2012; Zhang et Wang, 2006a). Elle peut être mise en lien avec la répartition subcellulaire des métaux au sein des proies qui a été clairement identifiée comme influençant le transfert des métaux vers les prédateurs (Guo et al., 2013; Zhang et Wang, 2006b), même si l'assimilation des éléments présents dans certaines fractions cellulaires reste encore discutée (Rainbow et al., 2011). Deuxièmement, les différences d'assimilation entre espèces vont également dépendre du métal considéré. Ainsi, une étude comparative du transfert trophique du cobalt et du zinc depuis *Artemia salina* jusqu'à deux espèces de poissons tropicaux (le poisson-lune argenté *Monodactylus argenteus* et le pavillon tacheté *Scatophagus argus*) a montré une assimilation différente du zinc, mais la même quantité de cobalt retenue par les deux espèces. Enfin, le taux d'ingestion peut lui aussi influencer sur la quantité de métal assimilé, comme montré chez le vivaneau des mangroves *Lutjanus argentimaculatus* pour lequel l'EA du cadmium, du

sélénium et du zinc diminue lorsque la quantité de nourriture ingérée augmente (Xu et Wang, 2002). Malgré la diversité des résultats obtenus par les différentes études concernant l'efficacité d'assimilation chez les poissons, il est à noter que l'EA d'un métal tel que le Cd est hautement variable, pouvant être aussi faible que 2 % chez le pagre *Acanthopagrus schlegelii* et 3 % chez la capucette *Menidia spp.* et pouvant atteindre 45 % chez la daurade *S. aurata* (Mathews et Fisher, 2008; Reinfelder et Fisher, 1994; Zhang et Wang, 2007a).

La bioaccumulation va également être déterminée par les mécanismes de séquestration cellulaire au sein des organes de stockage tels que le foie ou les reins. Parmi ces mécanismes, certaines protéines impliquées dans la détoxification des métaux telles que les métallothionéines ont été largement étudiées (Adam et al., 2010; Hogstrand et Haux, 1991). Plus récemment, la répartition subcellulaire a été analysée pour comparer la sensibilité de différentes espèces de poissons face à l'accumulation de métaux (Eyckmans et al., 2012; Leonard et al., 2014; Rosabal et al., 2015), mais cette approche n'a encore que peu été utilisée pour expliquer les différences d'accumulation entre les organismes marins (Wallace et al., 2003). Cette thématique sera d'avantage développée dans la partie II consacrée à la méthodologie.

Enfin, les capacités d'excrétion vont constituer le dernier levier contrôlant les concentrations internes en métaux. Chez les poissons, les principales voies d'élimination sont représentées par le rein via la libération d'urine et par le foie via l'excrétion biliaire (McGeer et al., 2011a). A l'instar de l'EA, les études ayant comparé les cinétiques d'élimination des métaux chez plusieurs espèces marines sont arrivées à diverses conclusions. Mathews et al., (2008) n'ont retrouvé aucune différence significative entre espèces en termes de vitesse d'élimination de divers éléments dans le corps entier de la daurade royale, du turbot et de la petite roussette sur une période de 25 jours, alors que Jeffree et al. en 2006 ont montré une élimination du Cd deux fois plus rapide chez le turbot que chez la roussette. De plus, même si les conditions expérimentales sont déterminantes et peuvent varier entre les études, les cinétiques d'élimination des métaux semblent grandement dépendre de l'espèce considérée. En effet, alors que le vivaneau des mangroves *Lutjanus argentimaculatus* présente une élimination du Cd continue et importante durant 31 jours de dépuración à l'échelle du corps entier, l'élimination reste très lente chez le bar rayé *Morone saxatilis* comme chez le bar européen *Dicentrarchus labrax* durant 14 jours, ne menant à une diminution significative de la

concentration totale de Cd qu'après 24 jours pour *D. labrax* (Baines et al., 2002; Mathews et Fisher, 2008).

Les différents paramètres biotiques vont cependant être soumis aux variations ontogéniques, métaboliques, à l'état physiologique ainsi qu'au sexe des poissons (Al-Yousuf et al., 2000; Cossa et al., 2012; Szczebak et Taylor, 2011), faisant de ces derniers des éléments à prendre en considération dans l'interprétation des processus d'accumulation des éléments métalliques. Enfin, comme l'accumulation des métaux augmente au cours du temps (Berntssen et al., 2001; Kim et al., 2006), les espèces à la longévité importante telles que les grands poissons pélagiques et les requins présentent en général de forte concentrations en métaux (Araújo and Cedeño-Macias, 2016; Endo et al., 2008; McKinney et al., 2016). La bioaccumulation sera ainsi souvent dépendante de l'âge et donc de la taille des individus (Canli and Atli, 2003; Kiszka et al., 2015).

## **Paramètres écologiques**

Comme montré lors d'études expérimentales, la dose d'exposition ainsi que la nature des proies déterminent les quantités de métaux accumulés par les consommateurs (Kim et al., 2006; Zhang et Wang, 2006b). De par le cycle des éléments métalliques dans l'environnement et les organismes marins, ces deux paramètres vont quant à eux fortement dépendre des caractéristiques écologiques des poissons comme l'occupation de l'habitat et les préférences alimentaires.

Il a ainsi été montré que pour 9 espèces de grands poissons pélagiques de l'océan Pacifique, la quantité de mercure accumulée dans le muscle augmentait avec la profondeur médiane d'occurrence dans la colonne d'eau, reflétant les concentrations de mercure organique dissous dans l'eau de mer (Choy et al., 2009). De plus, sur un large panel d'espèces incluant de nombreux poissons, échantillonnés dans le Golfe de Gascogne, les concentrations en mercure étaient supérieures chez les organismes à affinité benthique que chez les espèces pélagiques (Chouvelon et al., 2012a). La distribution dans la colonne d'eau constituait ainsi le facteur contribuant le plus à expliquer la variabilité d'accumulation du mercure, soulignant l'importance de ce paramètre dans la compréhension de l'exposition métallique des espèces marines de poissons.



En termes de distribution géographique, la présence de contaminations locales de l'habitat peut également intervenir dans la bioaccumulation. Ainsi, Diop et al. en 2016 ont retrouvé des concentrations métalliques très contrastées dans le muscle et le foie de la sardinelle *S. aurita* et la sole sénégalaise *S. senegalensis* en fonction des sites de prélèvements le long de la côte sénégalaise, reflétant la variabilité spatiale des rejets anthropiques.

D'autre part, en assumant que les métaux sont majoritairement assimilés par voie trophique chez les poissons marins, la contamination métallique au sein d'un habitat est souvent liée à un comportement de recherche alimentaire. Ainsi, il a été montré pour diverses espèces que la zone de capture des proies pouvait déterminer la bioaccumulation. En ce qui concerne le Cd, l'alimentation le long d'un gradient côte-large semble influencer l'accumulation chez deux espèces de requins de zones différentes : le requin-hâ *Galeorhinus galeus* en mer Celtique et le requin tigre *Galeocerdo cuvier* du nord-ouest Pacifique (Domi et al., 2005; Endo et al., 2008). Alors que l'accumulation est supérieure en zone côtière pour le premier, le deuxième présente une augmentation des concentrations en Cd due au changement ontogénique d'un habitat côtier vers un habitat plus océanique.

Ce changement de zone alimentaire implique généralement un changement de la composition des proies, qui se reflète sur les niveaux de contamination métallique. Ainsi, la consommation de proies benthiques par les juvéniles de tassergal *Pomatomus saltatrix* induit une plus forte exposition au mercure que l'ingestion de proies pélagiques par les adultes après un changement ontogénique de régime alimentaire (Szczebak et Taylor, 2011). De même, des différences d'accumulation du Cd ont été observées entre différents individus de thon germon *Thunnus alalunga* dans le Golfe de Gascogne. Les deux groupes de poissons présentaient également des signatures isotopiques traduisant des niches trophiques différentes, probablement basées sur la consommation de différentes espèces de céphalopodes (Das et al., 2000).

Au-delà de l'impact évident de l'habitat et du régime alimentaire sur la bioaccumulation, ces études mettent en évidence la grande variabilité intraspécifique en termes de niche trophique et la nécessité de se placer à l'échelle individuelle pour étudier les processus écologiques dans l'exposition et l'assimilation des métaux par les poissons marins.

Enfin, les différences d'accumulation entre espèces ou individus peuvent être le résultat de la combinaison de ces deux facteurs environnementaux (i.e. habitat et régime alimentaire).

Ainsi, chez deux espèces de raies électriques taxonomiquement très proches (*Torpedo nobiliana* et *Torpedo marmorata*) échantillonnées en mer Méditerranée, les plus fortes concentrations en cadmium, cuivre et arsenic retrouvées chez *T. marmorata* sont imputées à la composition des proies alors que les valeurs de mercure plus élevées chez *T. nobiliana* seraient dues à la présence de cette espèce à de plus grandes profondeurs (Barone et al., 2013).

## 6. OBJECTIFS DE LA THESE

---

Les objectifs principaux de ce travail sont de déterminer les mécanismes écologiques et biologiques influençant l'accumulation des métaux chez les poissons marins, afin de mieux comprendre la variabilité des niveaux de contamination observés entre différentes espèces, mais également entre individus d'une même espèce. En se basant sur le cas d'étude du courant des Canaries, une approche comprenant à la fois des études *in situ* et des expérimentations en milieu contrôlé complémentaires a ainsi été développée dans le but de répondre à quatre questions majeures :

- (i) Les espèces présentent-elles des réponses physiologiques différentes face à une exposition métallique et quelle en est l'implication sur la bioaccumulation ?

Au vu de la diversité des mécanismes de protection déployés par les organismes marins face aux stress environnementaux comprenant l'exposition aux métaux, on cherche par cet axe à évaluer l'influence de ces adaptations sur les cinétiques d'accumulation et d'élimination des métaux par les poissons.

- (ii) Les métaux sont-ils séquestrés différemment selon les espèces et quel en est le résultat sur leur détoxification et leur excrétion ?

L'objectif de ce deuxième point est d'identifier les stratégies de séquestration des métaux adoptées par les différentes espèces de poissons marins, et d'en tirer des interprétations sur

leur capacité à se prévenir des dommages engendrés par la toxicité de ces éléments, ainsi que sur leur capacité à les éliminer.

(iii) Quelle est la part du régime alimentaire dans la contamination des poissons ?

Au travers de cette question, l'objectif est de préciser quels sont les consommateurs les plus exposés par voie trophique aux éléments métalliques, et dans un second temps d'évaluer si le schéma constaté répond aux pressions anthropiques.

(iv) Les préférences d'habitat influent-elles sur la bioaccumulation ?

Le but est ici de déterminer si la distribution verticale (i.e. la répartition dans la colonne d'eau) et/ou la distance à la côte ont un impact sur les concentrations en métaux à l'échelle spécifique et individuelle.

# APPROCHES ET OUTILS

Ce chapitre a pour but de détailler la démarche choisie pour étudier la bioaccumulation des métaux chez les espèces marines de poissons du courant des Canaries, afin de mieux comprendre les paramètres qui sous-tendent la variabilité interspécifique et interindividuelle. Cette étude a été réalisée au travers de deux approches, l'une portant sur les particularités physiologiques et l'autre sur les mécanismes écologiques régissant la bioaccumulation. La première a consisté en une comparaison expérimentale des cinétiques d'accumulation et d'élimination et de l'organotropisme (i.e. la répartition tissulaire) du cadmium chez deux espèces de poissons présentes dans le courant des Canaries. Parallèlement, l'impact de la prise en charge du métal au niveau cellulaire, via la mesure des concentrations en métallothionéines (MT) et de la répartition subcellulaire du Cd, quant aux capacités d'élimination et de détoxification a été mesuré. La deuxième s'est traduite par l'analyse couplée des concentrations métalliques et de différents paramètres permettant de retracer l'habitat et le régime alimentaire des individus, que sont les rapports isotopiques du carbone et de l'azote ainsi que la composition en acides gras des lipides de réserve. Ces deux approches (expérimentale et *in situ*) ainsi que les différentes techniques analytiques utilisées sont détaillées dans les deux sections suivantes.

## 1. APPROCHE EXPERIMENTALE

---

Les paramètres écologiques ne suffisent pas toujours à expliquer les différences d'accumulation des métaux par les différentes espèces de poissons marins, puisque des espèces partageant le même habitat (Bank et al., 2007; Barhoumi et al., 2009; Siscar et al., 2013) ou partageant la même niche trophique (Bodin et al., 2017; Kiszka et al., 2015) peuvent présenter des concentrations métalliques contrastées. Les études expérimentales se révèlent alors cruciales car elles permettent de s'affranchir de la variabilité des conditions environnementales et de mettre ainsi en évidence l'implication de mécanismes uniquement relatifs à la biologie et la physiologie des espèces. Selon cette démarche, deux études expérimentales ont été menées au Centre de documentation, de recherche et d'expérimentations sur les pollutions accidentelles des eaux (CEDRE), dans le but de

comparer les réponses de deux espèces présentes dans le CCLME et aux caractéristiques écologiques contrastées, face aux mêmes conditions d'exposition au Cd.

## Le bar européen



Figure 6 Le bar européen *Dicentrarchus labrax*.

Le bar européen *Dicentrarchus labrax* (Linné, 1758) est un poisson démersal de la famille des Moronidés (Figure 6), dont l'aire de répartition s'étend dans l'Atlantique Nord-Est de 60° N (Sud de la Norvège) à 30° N (côtes du Maroc et archipel des Canaries). Il est présent en mer d'Irlande, mer du Nord et mer Baltique, et il colonise toute la mer Méditerranée ainsi que la mer Noire. A l'âge adulte, la taille moyenne du bar est de 50 cm, mais il peut atteindre 1 m pour plus de 12 kg et vivre jusqu'à une trentaine d'années. Le bar est un poisson côtier, fréquent notamment le long des côtes rocheuses. Il peut être trouvé jusqu'à une centaine de mètres de fond, et jusqu'à environ 80 km des côtes. C'est un poisson euryhalin, c'est à dire capable de supporter de grandes variations de salinité, pouvant ainsi être observé dans des baies et des estuaires. Le bar est un prédateur carnassier, les stades les plus jeunes se nourrissant essentiellement de mysidacés, d'amphipodes, de copépodes, et de larves de décapodes et de cirripèdes. Le régime alimentaire des bars adultes est également diversifié, mais il est cependant dominé par les crustacés décapodes brachyours, les poissons et les céphalopodes (López et al., 2015). Le bar est un prédateur vorace qui peut ingérer des proies de grande taille. Il chasse aussi bien de jour que de nuit, sur le fond ou entre deux eaux.

Malgré sa sensibilité vis-à-vis de l'exposition au Cd, causant entre autres stress oxydant, altérations cellulaires, troubles du métabolisme énergétique, et inhibition des comportements naturels (Cattani et al., 1996; Faucher et al., 2008; Giari et al., 2007; Roméo et al., 2000), le bar est connu pour répondre à la contamination via la synthèse *de novo* de

MT, lui permettant de réduire la toxicité du Cd assimilé (Cattani et al., 1996; Jebali et al., 2008a). En milieu naturel, de fortes corrélations ont ainsi été observées chez cette espèce entre concentrations en MT et en Cd dans le foie (Fernandes et al., 2007), suggérant l'induction de la synthèse de MT par le métal et/ou une plus forte accumulation de ce dernier liée à l'abondance des MT.

## La sole sénégalaise



Figure 7 La sole sénégalaise *Solea senegalensis*.

La sole sénégalaise *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) est un poisson plat de la famille des Soléidés (Figure 7), présent dans l'Atlantique Centre Est depuis le Golfe de Gascogne (47°N) jusqu'au Sénégal (14°N), et dans une moindre mesure dans la partie occidentale de la Méditerranée. Sa taille moyenne est de 45 cm mais elle peut atteindre 60 cm. Tout comme le bar, cette espèce affectionne les fonds côtiers jusqu'à 100 m de profondeur et se retrouve en milieu saumâtre. C'est une espèce benthique vivant dans les fonds sableux ou vaseux et se nourrissant d'invertébrés benthiques comme des annélides polychètes, des mollusques bivalves et des petits crustacés (Teixeira et Cabral, 2010).

La sole est également sensible à la toxicité du Cd, qui provoque entre autres un stress oxydant et des altérations cellulaires (Costa et al., 2012; Oliva et al., 2012) et est capable de limiter cette toxicité par l'intervention de défenses antioxydantes et l'induction de la synthèse de MT (Fonseca et al., 2011; Siscar et al., 2013). La capacité de synthèse de MT chez la sole semble toutefois différer d'autres espèces comme la daurade royale *S. aurata*, conduisant à une plus faible accumulation du Cd mais également à une plus forte sensibilité face à la toxicité du métal (Kalman et al., 2010).

## Choix des espèces

Ces deux espèces ont été retenues car elles présentent des caractéristiques écologiques communes (i.e. même zone géographique et profondeur d'évolution) mais des habitats (i.e. démersal pour le bar *versus* benthique pour la sole) et régimes alimentaires (poissons et invertébrés vs invertébrés) distincts. De par ces divergences écologiques, leur éloignement taxonomique et leur différence de comportement (espèce vagile pour le bar vs sédentaire pour la sole), des réponses contrastées sont attendues en termes de synthèse de MT et de stratégies de séquestrations, comme suggéré par des observations *in situ* sur les défenses antioxydantes (Fonseca et al., 2011), menant potentiellement à des différences de bioaccumulation du Cd. Elles sont toutes les deux présentes dans l'écosystème du courant des Canaries, jusqu'au sud de Maroc pour le bar et jusqu'au sud du Sénégal pour la sole. Par ailleurs, leur approvisionnement est possible dans des classes de taille similaires à partir de fermes aquacoles (i.e. Aquastream dans le Morbihan pour le bar et la Ferme Marine de l'Adour dans le pays basque pour la sole).

## Protocole expérimental

Le choix de l'élément métallique étudié s'est porté sur le Cd, du fait de son abondance dans l'écosystème marin du courant des Canaries, liée aux rejets anthropiques et à l'activité de l'upwelling. Il est de plus un des éléments ciblés par le programme ANR EPURE dans lequel s'inclue ce travail de thèse. Une contamination chronique par voie trophique et à des concentrations retrouvées dans des proies potentielles différentes (i.e. 3,5 ppm pour la première et 22,9 ppm pour la deuxième), telles que des bivalves ou des polychètes du courant des Canaries (Bodin et al., 2013; Maanan, 2008; Rouhi et al., 2007) a été retenue, pour s'approcher au mieux de la réalité environnementale.

Les espèces ont chacune été séparées en deux conditions : l'une « témoin » où les poissons ont été nourris avec un granulé commercial, et l'autre « contaminée » où les individus ont reçu un granulé enrichi en Cd. Les poissons contaminés ont d'abord été exposés au Cd pendant 2 mois avant d'être nourris de la même façon que les témoins pendant 1 mois (exposition à 3,5 ppm) ou 2 mois (exposition à 22,9 ppm). Des échantillonnages ont été effectués à intervalle de temps régulier (voir Figure 8). A chaque échantillonnage, trois



individus par bassin, soit neuf poissons par condition ont été échantillonnés. Le foie, le muscle dorsal (découpe standardisée par tous les individus) et la vésicule biliaire ont été prélevés avec des outils en céramique pour éviter toute contamination métallique. Le foie a été prélevé comme organe d'accumulation primaire. Il a été préféré à d'autres en raison de son fort potentiel de stockage chez ces espèces. Il a par exemple été montré qu'il pouvait contenir dix fois plus de Cd que le rein chez la sole sénégalaise (Siscar et al., 2014). Le muscle a quant à lui été prélevé comme organe d'accumulation secondaire et la vésicule biliaire comme vecteur d'élimination. En effet, de nombreuses études ont montré chez différentes espèces de poissons que la bile constituait une voie d'excrétion des métaux à partir du foie, vers l'intestin et le milieu externe (Chowdhury et al., 2004, 2003, Hauser-Davis et al., 2012a, 2014a, 2016). Différentes mesures biométriques ont également été effectuées sur le corps et le foie de chaque individu prélevé afin de mettre en évidence un éventuel impact du Cd sur la croissance.

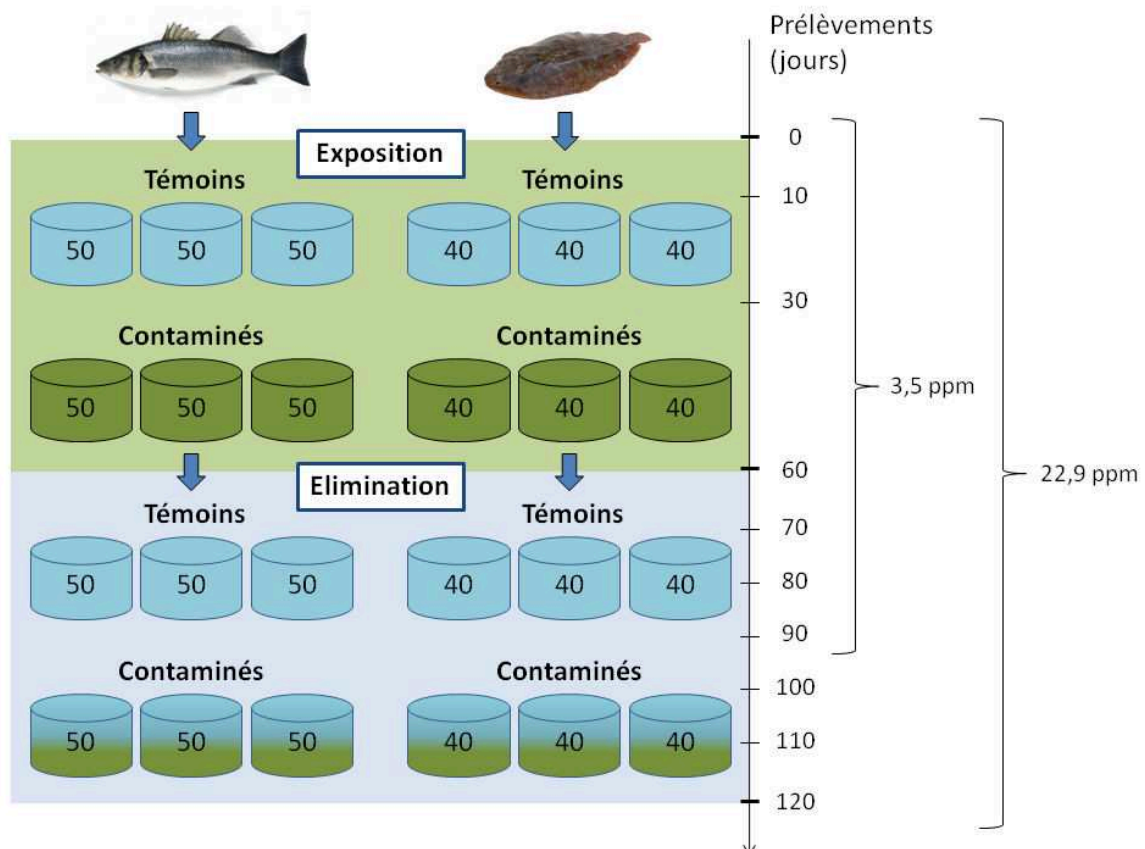


Figure 8 Schéma du dispositif expérimental impliquant 2 espèces (bar et sole) et deux conditions (témoins et contaminés). Chaque bassin contient 50 individus pour le bar et 40 pour la sole afin de respecter des densités similaires. Deux études ont été menées, la première impliquant une exposition à 3,5 ppm de cadmium, l'autre à 22,9 ppm.

## Dosage des métallothionéines

Parmi les divers mécanismes physiologiques permettant de lutter contre la toxicité des métaux, les métallothionéines (MT), des protéines cytosoliques de faible poids moléculaires (environ 6 kDa chez les poissons) et impliquées dans la séquestration des métaux, sont ubiquistes dans le règne animal (Adam et al., 2010). Une de leur principale caractéristique est la présence d'un grand nombre de groupements thiols auxquels les métaux présentent une forte affinité, faisant de ces protéines d'importants sites de fixation pour les éléments métalliques. Ceci leur confère un rôle primordial dans la régulation homéostatique des métaux essentiels tels que le cuivre et le zinc mais également un rôle secondaire de séquestration des métaux toxiques tels que le cadmium et le mercure. Cette capacité de séquestration limite ainsi l'interaction des ions métalliques avec d'autres biomolécules cellulaires et prévient des atteintes toxiques associées aux formes ioniques libres qui induisent la plus forte cytotoxicité.

La synthèse de MT peut être induite par une exposition métallique (Cheung et al., 2004; George et al., 1996) ce qui conduit à leur utilisation courante en tant que marqueur de contamination chez les poissons marins (Hauser-Davis et al., 2012b). Toutefois, cette biosynthèse peut également être influencée par de nombreux facteurs environnementaux et endogènes relatifs à la saison, le sexe et l'état de maturation des poissons (Hylland et al., 1998) et également ne pas correspondre aux niveaux de contamination. Chez les espèces considérées au cours de ces travaux, il a par exemple été montré que les concentrations hépatiques en MT chez la sole sénégalaise variaient suivant la température en expérimental (Siscar et al., 2014), et qu'elles ne correspondaient pas au gradient d'exposition au mercure chez le bar *in situ* (Mieiro et al., 2011). Les métallothionéines semblent cependant provoquer une plus grande accumulation des métaux à l'échelle du corps entier chez d'autres espèces de poissons (Long et Wang, 2005a, 2005b), ainsi qu'à l'échelle cellulaire comme montré sur des hépatocytes isolés de rat (Stacey et Klaassen, 1980). De plus, plusieurs études *in situ* ont montré une forte corrélation entre concentrations en MT et en Cd, notamment chez le bar européen avec un coefficient de corrélation de 0,99 (Fernandes et al., 2008, 2007), suggérant l'implication des MT dans la variabilité observée en termes de bioaccumulation.

L'hypothèse selon laquelle les MT augmenteraient l'accumulation du Cd n'a pourtant que peu été explorée chez les poissons marins (Long et Wang, 2005a, 2005b).

Dans le cadre de ces travaux de thèse, il est donc apparu pertinent de mesurer la réponse de nos deux différentes espèces concernant la biosynthèse et l'utilisation de ces protéines face à l'exposition au Cd. L'éventuel déclenchement de la synthèse *de novo* des MT ainsi que leur rôle potentiel dans les cinétiques d'accumulation du Cd ont donc été étudiés par la mesure des concentrations en MT obtenue par spectrophotométrie dans le foie des poissons, afin de répondre à la problématique (i) qui concerne le lien entre réponses physiologiques et bioaccumulation.

## Répartition du cadmium entre organes et au sein des cellules

La répartition d'un métal entre les organes d'un individu (i.e. l'organotropisme) dépend tout d'abord de la voie d'exposition (directe *versus* trophique) (Chowdhury et al., 2005). Après exposition par voie trophique, la répartition métallique chez les poissons marins sera souvent observée dans cet ordre : intestin > foie  $\approx$  reins > branchies > muscle (Berntssen et al., 2001; Kim et al., 2006). L'organotropisme va cependant également refléter les différentes stratégies de stockage ou d'élimination mises en place par les espèces. Ainsi, il a été montré que l'anguille européenne et la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* exposées à l'argent ne présentent pas le même organotropisme, résultant en différentes capacités d'élimination (Hogstrand et al., 2003). Alors que l'argent est remobilisé des différents organes tels que les reins vers le foie pour y être accumulé chez la truite, l'anguille montre une élimination du métal par excrétion biliaire et via les branchies. Ces différents schémas de répartition entre organes résultent en une élimination de la moitié du métal à l'échelle du corps entier chez l'anguille, alors que la quantité totale de métal n'évolue pas chez la truite après 67 jours de dépuración.

Récemment, certaines études se sont penchées sur la capacité des poissons à réguler la toxicité des métaux en fonction de leur répartition subcellulaire, et ont de nouveau mis en évidence des différences entre espèces (Eyckmans et al., 2012; Leonard et al., 2014). L'étude d'Eyckman et al. s'est focalisé sur l'accumulation, l'organotropisme et la répartition cellulaire du cuivre chez trois espèces d'eau douce : la truite arc-en-ciel, la carpe commune *Cyprinus*

*carpio* et le carassin argenté *Carassius gibelio*. Les deux espèces montrant le facteur d'accumulation le plus fort dans le foie (la truite et le carassin) à la fin d'une période d'exposition d'un mois, présentent également l'augmentation la plus forte de la concentration en Cu dans la fraction contenant les MT. Sans que les auteurs n'interprètent ce résultat, ces observations suggèrent que la répartition subcellulaire du métal, et notamment son association aux MT, conditionne son accumulation à l'échelle de l'organe entier. En revanche, très peu d'études ont cherché à mettre en lien la distribution cellulaire des métaux avec leurs cinétiques d'accumulation et d'élimination. (Wallace et al., 2003) ont exposé deux bivalves *Macoma balthica* et *Potamocorbula amurensis* à du Cd et du zinc pendant 14 jours, et n'ont pas observé de diminution de la quantité de métal lié aux MT durant 21 jours de dépuration, laissant à penser que les MT ne seraient pas impliquées dans l'excrétion des métaux. Toutefois, plusieurs études ont constaté la présence de métaux complexés à des MT dans la bile de poissons au cours d'expositions expérimentales, indiquant que ces protéines constituent bien un vecteur d'élimination des métaux via l'excrétion biliaire (Hauser-Davis et al., 2014a, 2016).

Afin de mieux comprendre le rôle de ces mécanismes (i.e. organotropisme et répartition subcellulaire) chez nos deux espèces, les concentrations en Cd ont été mesurées par ICP-MS après minéralisation des échantillons, dans les tissus entiers (foie, muscle, bile) mais également dans différentes fractions subcellulaires (foie), obtenues suivant généralement le protocole de (Rosabal et al., 2015), lui-même adapté de celui de (Wallace et al., 2003). Selon ce protocole, un échantillon de foie est broyé puis séparé en différentes fractions après centrifugations successives résultant à chaque étape en l'obtention de surnageants (S) et de culots (C) (voir Figure 9). Six fractions majeurs ont ainsi été étudiées : la membrane cellulaire (débris cellulaires) ; les granules riches en métaux (metal-rich granules : MRG) ; les mitochondries ; le système endomembranaire regroupant le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et diverses vésicules (organites) ; des protéines cytosoliques stables à la chaleur telles que les métallothionéines (heat-stable proteins : HSP) et d'autres dénaturées à la chaleur comptant de nombreuses enzymes (heat-denaturated proteins).

D'autre part, alors que l'accumulation du Cd est connue pour interférer avec d'autres métaux essentiels tels que le zinc et ainsi conduire à un dérèglement de l'homéostasie (Moulis, 2010), ces éléments essentiels confèrent une protection face à la toxicité du Cd de

par leur propriétés antioxydantes (Martínez-Álvarez et al., 2005; Talas et al., 2008). Les concentrations en 7 métaux essentiels (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Se et Zn) ont donc également été mesurées pour prédire la sensibilité de nos deux espèces suite à l'exposition au Cd.

Ces différentes analyses sur la répartition subcellulaire des métaux avaient pour objectif de répondre à la problématique concernant les différentes stratégies de séquestration des métaux et l'impact sur leur détoxification et leur excrétion (ii).

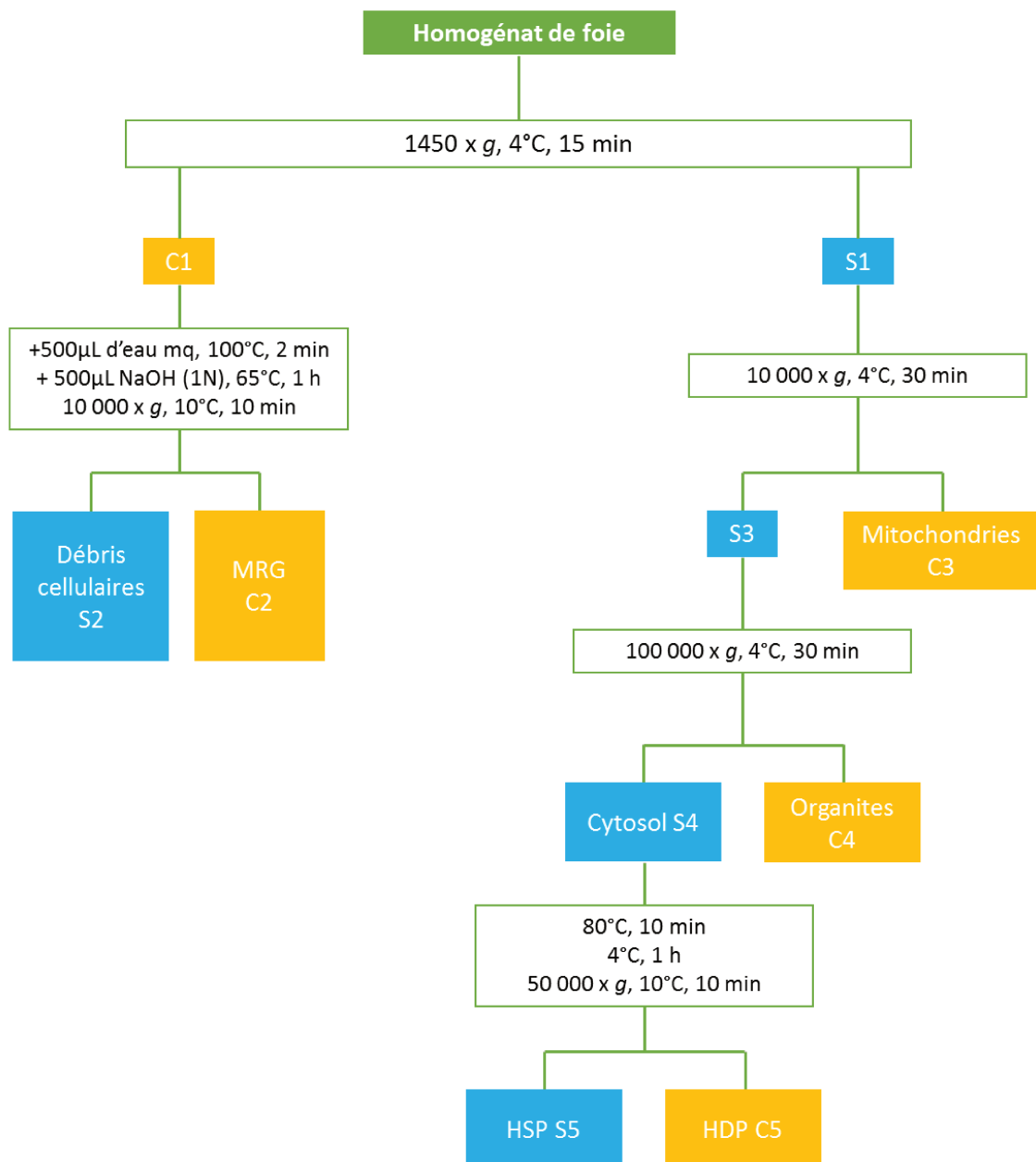


Figure 9 Protocole de séparation des différentes fractions subcellulaires appliqué au foie de *D. labrax* et *S. senegalensis*. MRG : granules riches en métaux ; HSP : protéines stables à la chaleur incluant les métallothionéines ; HDP : protéines dénaturées à la chaleur. Adapté de (Rosabal et al., 2015).

## 2. APPROCHE EN MILIEU NATUREL

---

### Echantillonnage

Un échantillonnage de 137 poissons appartenant à 23 espèces différentes a été réalisé le long du littoral sénégalais au cours d'une campagne océanographique du projet AWA « Approche écosystémique de la gestion des pêches et de l'environnement marin dans les eaux ouest-africaines », en mars 2014 à bord du navire océanographique « Thalassa ». Les poissons ont été capturés au chalut de fond à 5 stations de prélèvements allant de l'extrême nord (Saint-Louis) à l'extrême sud du pays (Casamance) afin d'obtenir différentes conditions environnementales (voir Figure 10). Les espèces ont été sélectionnées de façon à couvrir un large panel de caractéristiques écologiques et présentent des habitats et régimes alimentaires très divers, avec des niveaux trophiques allant de 3 à 4,5 selon fishbase (Froese et Pauly, 2017) (voir Tableau 3).

Après avoir été congelés à bord, les poissons ont été apportés au Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR). Le foie et un échantillon de muscle dorsal (découpe standardisée pour tous les individus) ont été prélevés avec des outils en céramique pour éviter toute contamination métallique. La moitié du foie et l'échantillon de muscle ont été lyophilisés en vue de l'analyse des métaux. Les échantillons de muscle ont été pesés avant et après lyophilisation afin de pouvoir calculer la concentration en métaux par poids frais d'échantillon. L'autre moitié de foie a été broyée manuellement dans une solution de chloroforme/méthanol en vue de l'analyse des acides gras.



Figure 10 Carte des sites de prélèvements au cours de la campagne océanographique AWA en mars 2014.

Station	Espèce	n	NT	Habitat horizontal	Habitat vertical	Profondeur (m)
Saint Louis	<i>Brotula barbata</i>	4	3,8	Océanique	Démersal	33-37
	<i>Merluccius senegalensis</i>	5	4,5	Océanique	Démersal	33-37
	<i>Pterothrissus belloci</i>	5	3	Océanique	Démersal	33-37
	<i>Trichiurus lepturus</i>	5	4,5	Océanique	Benthopélagique	33-37
	<i>Zeus faber</i>	5	4,5	Océanique	Benthopélagique	33-37
Grande côte	<i>Trachurus trecae</i>	5	3,5	Côtier	Benthopélagique	30-40
Dakar	<i>Boops boops</i>	5	3	Côtier	Démersal	66-81
	<i>Caranx rhonchus</i>	4	3,6	Côtier	Benthopélagique	66-81
	<i>Diplodus bellottii</i>	5	3,5	Côtier	Démersal	22-23
	<i>Pseudupeneus prayensis</i>	5	3,2	Côtier	Démersal	22-23
	<i>Scomber japonicus</i>	5	3,4	Océanique	Pélagique	66-81
	<i>Trachurus trecae</i>	5	3,5	Côtier	Benthopélagique	22-23
Saloum	<i>Chaetodon hoefleri</i>	5	3,5	Côtier	Démersal	49-81
	<i>Chelidonichthys gabonensis</i>	5	3,6	Côtier	Démersal	49-81
	<i>Dentex canariensis</i>	5	3,6	Côtier	Démersal	49-81
	<i>Dicologlossa hexophthalma</i>	5	3,4	Côtier	Démersal	49-81
	<i>Plectorhinchus mediterraneus</i>	5	3,5	Côtier	Démersal	49-81
	<i>Pseudupeneus prayensis</i>	5	3,2	Côtier	Démersal	49-81
	<i>Sphoeroides spengleri</i>	4	3,2	Côtier	Démersal	49-81
	<i>Trachurus trecae</i>	5	3,5	Côtier	Benthopélagique	49-81
	<i>Umbrina canariensis</i>	5	3,4	Océanique	Démersal	49-81
Casamance	<i>Brachydeuterus auritus</i>	5	3	Côtier	Benthopélagique	14-15
	<i>Caranx rhonchus</i>	5	3,6	Côtier	Benthopélagique	14-15
	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	10	3,5	Côtier	Pélagique	17-18
	<i>Galeoides decadactylus</i>	5	3,6	Côtier	Démersal	14-15
	<i>Selene dorsalis</i>	5	4,1	Côtier	Démersal	14-15
	<i>Sphyraena guachancho</i>	5	4,4	Côtier	Pélagique	14-15

Tableau 3 Caractéristiques écologiques et sites de prélèvement des espèces étudiées. n = nombre d'individus ; NT = niveau trophique ; Stations = A : Saint-Louis, B : Grande-Côte, C : Hann, D : Saloum, E : Casamance ; P = nature des proies (1 : détritus + phytoplancton ; 2 : zooplancton + invertébrés ; 3 : invertébrés ; 4 : invertébrés + poissons ; 5 : poissons).



## **Analyse des métaux**

Lors d'une contamination par voie trophique, le foie est le premier organe que les métaux rencontrent après leur passage à travers la barrière intestinale, faisant de lui un des principaux organes d'accumulation chez les vertébrés, y compris chez les poissons (Berntssen et al., 2001; Kim et al., 2006). Un ensemble de 13 éléments métalliques (i.e. As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Ni, Pb, Sn, U, et Zn) choisis pour leur présence rapportée dans l'environnement et les organismes marins de la côte sénégalaise (Bodin et al., 2013; Diop et al., 2015, 2016a) ont ainsi été mesurés par spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif (ICP-MS) dans cet organe. Deux stations ont été sélectionnées pour cette analyse (Dakar et Casamance) de par le fort contraste en termes de pression anthropique. Ces analyses avaient pour but de comparer les teneurs en métaux dans le foie au régime alimentaire des poissons estimé à partir des profils en acides gras et isotopes stables afin de répondre au questionnement (iii), sur l'influence de la composition des proies dans la contamination des poissons.

Contrairement aux autres éléments métalliques, le mercure s'accumule en grande quantité dans le muscle des poissons, où il est en général présent à plus 95 % sous forme de méthylmercure (Bloom, 1992). Il a donc été dosé par spectrophotométrie d'absorption atomique (AAS) dans le muscle de l'ensemble des poissons échantillonnés, toutes stations confondues. Même si les différents métaux peuvent se comporter différemment dans l'environnement ou au sein des organismes, le mercure a été sélectionné comme exemple pour répondre au questionnement (iv), en étant comparé aux compositions en isotopes stables, afin d'évaluer l'implication de l'habitat dans l'exposition aux métaux.

## **Analyse des isotopes stables du carbone et de l'azote**

Les isotopes sont des atomes d'un même élément qui comptent le même nombre de protons mais un nombre de neutrons différent, leur conférant des masses atomiques et des propriétés physicochimiques différentes. On distingue les isotopes radioactifs, qui ont la particularité de se désintégrer au cours du temps en éléments plus légers (c.a.d. comptant moins de neutrons), des isotopes stables qui conservent la même forme au cours du temps.

En écologie trophique, les isotopes stables du carbone et de l'azote sont les plus couramment utilisés, basé sur le fait que la composition isotopique et donc le rapport entre l'abondance d'un isotope lourd sur un léger (e.g.  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) de ces atomes varie de manière relativement prédictible entre les organismes tout au long de la chaîne trophique. En effet, durant les réactions chimiques métaboliques, les isotopes légers sont utilisés plus rapidement, induisant un déséquilibre des rapports isotopiques et une accumulation des isotopes lourds à chaque niveau trophique. Cette augmentation de la teneur en isotopes lourds à chaque niveau trophique est appelée fractionnement trophique (Fry, 2007, 1988). Les rapports isotopiques utilisés en écologie sont exprimés en unité  $\delta$  (‰) et comparés aux rapports définis par des standards internationaux. Le standard utilisé pour le carbone est une roche fossile du Carbonifère, le Pee Dee Belemnite, alors que celui utilisé pour l'azote correspond à l'azote atmosphérique. Le rapport isotopique d'un échantillon est calculé par la formule suivante :

$$\delta^{15}\text{N} \text{ ou } ^{13}\text{C} = [(R_{\text{échantillon}}/R_{\text{standard}}) - 1] \times 1000 \text{ avec } R = ^{15}\text{N}/^{14}\text{N} \text{ ou } ^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ respectivement}$$

Les différents producteurs primaires présentent des rapports isotopiques caractéristiques, liés aux différentes sources de carbone et d'azote et/ou voies métaboliques utilisées lors de la photosynthèse, permettant de les distinguer au sein d'un écosystème (Fry et Sherr, 1989). De plus, le fractionnement isotopique entre une source et son consommateur est bien établi et correspond à une augmentation du  $\delta^{13}\text{C}$  d'environ 1 ‰ et du  $\delta^{15}\text{N}$  d'environ 2,5 ‰ (entre un producteur primaire et un consommateur primaire) ou 3,4 ‰ (entre un producteur primaire et un prédateur) (Zanden et Rasmussen, 2001) (Figure 11).

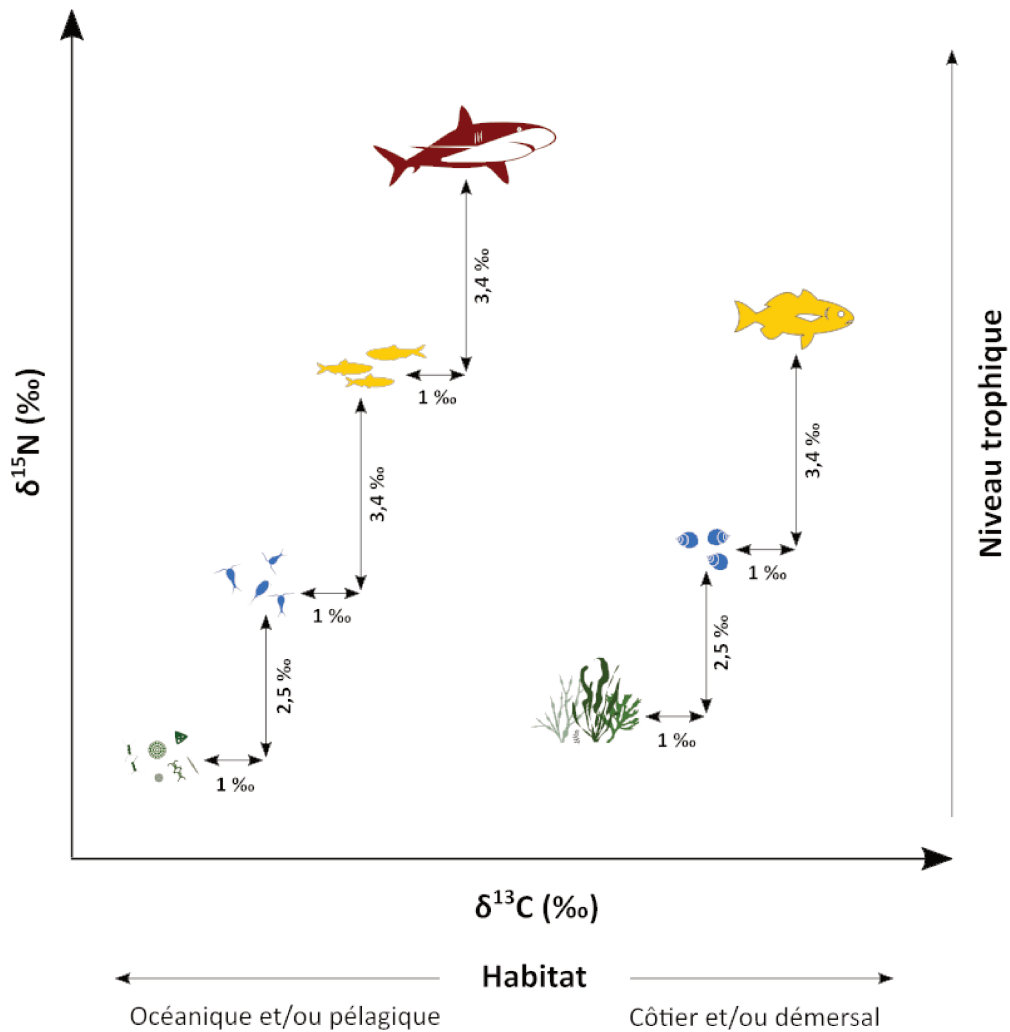


Figure 11 Fractionnement trophique du carbone et de l'azote dans deux chaînes alimentaires supportées par différents producteurs primaires (en vert : phytoplancton océanique versus macroalgues côtières). En bleu : les consommateurs primaires, en jaune : les consommateurs secondaires (prédateur de niveau I), en rouge : un prédateur de niveau II. Les rapports isotopiques du carbone ( $\delta^{13}\text{C}$ ) sont représentés en abscisse, ceux de l'azote ( $\delta^{15}\text{N}$ ) en ordonnée.

Les valeurs de  $\delta^{13}\text{C}$  permettent également de retracer la zone d'alimentation et/ou l'habitat des consommateurs. En effet, la signature des producteurs primaires diffère spatialement : un faible  $\delta^{13}\text{C}$  indiquera l'appartenance à un réseau trophique basé sur du phytoplancton et donc une affinité océanique ou/et pélagique, alors qu'un fort  $\delta^{13}\text{C}$  traduira l'appartenance à une chaîne alimentaire supportée par des macroalgues et une affinité côtière et/ou démersale. Les valeurs de  $\delta^{15}\text{N}$  sont quant à elles d'avantage utilisées comme marqueurs de la position trophique relative, ou absolue après retranchement de la ligne de base de l'écosystème (i.e. le  $\delta^{15}\text{N}$  des producteurs primaires). L'association des isotopes stables du

carbone et de l'azote fournit donc une information en plusieurs dimension sur l'écologie trophique des organismes d'intérêt qui aboutit à la notion de niche trophique, ou encore niche isotopique.

A l'instar de nombreuses autres études sur la contamination métallique des poissons marins (Chouvelon et al., 2012a; Das et al., 2000; Domi et al., 2005), les isotopes stables ont été ici utilisés pour déterminer le régime alimentaire des individus et les regrouper par guildes trophiques, afin de répondre au questionnement (iii) sur l'impact de la composition de la composition des proies. Ils ont également permis d'évaluer l'influence du niveau trophique ( $\delta^{15}\text{N}$ ) et de l'habitat ( $\delta^{13}\text{C}$ ) dans la contamination des individus par le mercure, dans le cadre de l'axe (iv).

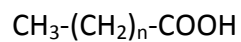
Les lipides étant appauvris en  $^{13}\text{C}$  par rapport aux autres composés comme les protéines ou le glycogène (DeNiro et Epstein, 1977), leur présence dans les échantillons peut modifier les valeurs de  $\delta^{13}\text{C}$ . Les rapports isotopiques du carbone et de l'azote ont donc été mesurés dans le muscle, cet organe présentant un contenu en lipides plus faible que d'autres organes tels que le foie (Njinkoué et al., 2002). D'autre part, le renouvellement du carbone et de l'hydrogène étant plus lent dans le muscle que dans le foie (Buchheister et Latour, 2010), les signatures isotopiques du muscle permettent une vision plus intégrée dans le temps des conditions environnementales conduisant à l'accumulation des métaux.

## **Analyse de la composition en acides gras des lipides neutres**

Les lipides forment un grand groupe de molécules très hétérogènes dans leurs structures et leurs fonctions. Ils présentent un caractère physique commun : ils sont peu ou pas solubles dans l'eau. Ce degré d'insolubilité dépend de leur polarité, paramètre qui permet également de les différencier en deux classes, supportant deux grandes fonctions biologiques. Ainsi, les lipides de structure (i.e. membranaires), présentant un domaine hydrophobe et une tête hydrophile qui leur confère un caractère polaire, interviennent dans la constitution des membranes cellulaires via la formation de bicouches lipidiques. D'autre part, les lipides de réserve sont uniquement constitués de domaines hydrophobes les rendant plus apolaires (i.e. neutres), et représentent une importante forme de stockage énergétique. Alors que les

phospholipides et les stérols constituent les principales classes de lipides membranaires, les lipides neutres comprennent quant à eux des triacylglycérols et des esters de stérols.

Les acides gras (AG) sont les constituants majoritaires des lipides. Ils comportent une structure commune comportant un groupement méthyle (CH<sub>3</sub>), suivi d'une chaîne linéaire de carbone et d'hydrogène (CH<sub>2</sub>) longue de 4 à 36 atomes de carbone, et se terminant par un groupement carboxyle (COOH). Leur formule générale est ainsi :



Les acides gras sont classés en trois grands groupes, correspondant à leur degré global d'insaturation (i.e. le nombre de doubles liaisons entre deux atomes de carbone successifs : -HC=CH-). On distingue de la sorte les acides gras saturés ne comportant pas de doubles liaisons, les acides gras monoinsaturés présentant une double liaison, et les acides gras polyinsaturés comportant plusieurs doubles liaisons au sein de leur chaîne hydrocarbonée. La nomenclature des acides gras indique le nombre de carbones (n) suivi du nombre de doubles liaisons (:x) et de la position du premier carbone portant une double liaison en partant du carbone terminal (CH<sub>3</sub>) (i.e. n-y). Par exemple, l'acide docosahexaénoïque (DHA) est un AG « oméga 3 » à 22 carbones et 6 doubles liaisons dont la dernière est située sur le carbone 19 (22-3), et sera donc noté 22:6n-3 ou encore 22:6ω3.

Le 16:0 (acide palmitique), précurseur des autres AG, est synthétisé à partir d'Acétyl-coenzyme A (Acetyl-CoA). Ensuite, des étapes d'élongation (i.e. ajout de 2 carbones dans les mitochondries) et de désaturation (ajout d'une double liaison dans le réticulum endoplasmique) assurées par des enzymes (respectivement des élongases et des désaturases), ainsi que des réactions de β-oxydation (dans les péroxysomes), permettent d'obtenir les différents AG nécessaires au métabolisme (Figure 12).

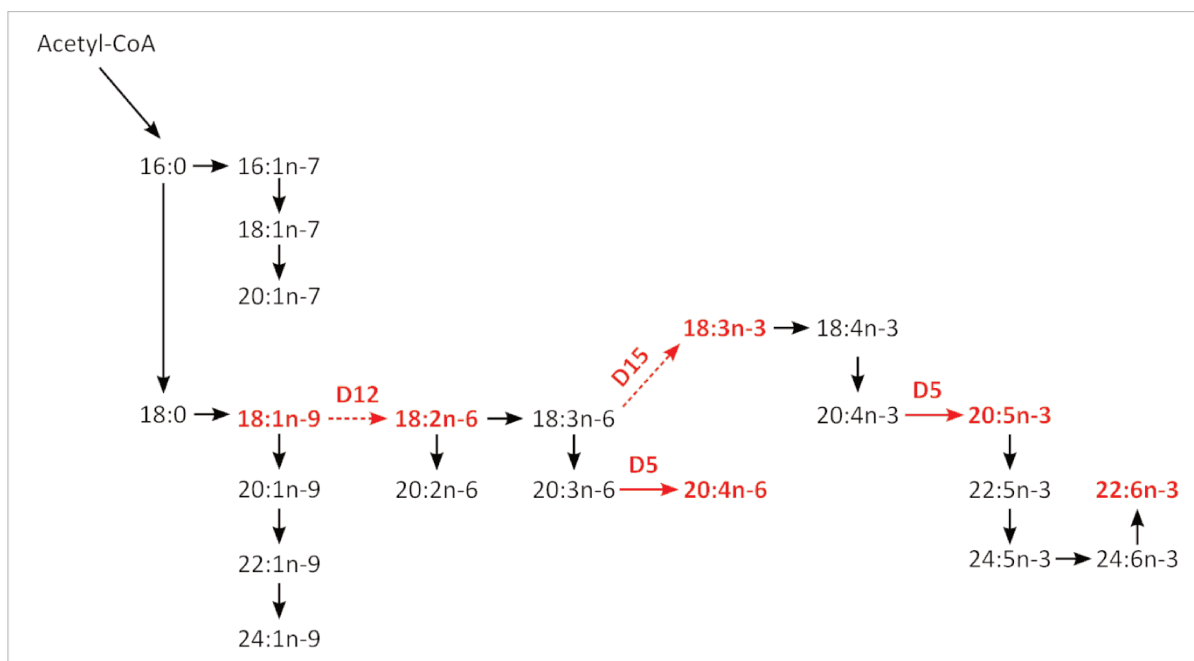


Figure 12 Principales voies de biosynthèse des acides gras chez les animaux. Les flèches horizontales indiquent une désaturation, les flèches verticales descendantes correspondent à une élongation, les ascendantes à une  $\beta$ -oxydation. Les D représentent les désaturases non (en pointillés) ou peu (trait plein) actives chez les poissons marins. Les AG en rouge proviennent majoritairement de sources alimentaires. Adapté de Kelly et Scheibling, 2012.

Les animaux sont capables de synthétiser *de novo* les AG saturés et les omégas 7 et 9, mais incapables de produire le 18:2n-6 (acide linoléique) ni le 18:3n-3 (acide linoléique) car ils ne possèdent pas les D15 et D12-désaturases présentes chez les autotrophes (flèches rouges sur la Figure 12). De plus, l'activité de la D5-désaturase est faible voire inexistante chez les poissons marins (Tocher, 2003), limitant aussi la synthèse d'AG poly-insaturés tels que le 20:4n-6 (acide arachidonique ; ARA), le 20:5n-3 (acide eicosapentaénoïque ; EPA) et par conséquent le 22:6n-3 (acide docosahexaénoïque ; DHA). Ces AG, principalement des omégas 3 et 6, non synthétisés par les poissons marins et pourtant indispensables au bon fonctionnement des organismes (Arts et al., 2001), devront donc être obtenus grâce à l'alimentation et sont qualifiés d'AG « essentiels ». De plus, lorsqu'un apport lipidique suffisant est assuré par l'alimentation, la synthèse *de novo* des AG est ralentie voire inhibée et la majorité des AG, incluant par exemple le 18:1n-9 (acide oléique), proviennent de sources alimentaires. Lors du transfert trophique, l'intégrité structurale des AG est en général conservée, permettant de les utiliser en tant que traceurs des relations proie-prédateur. Ainsi, il a été montré lors d'études expérimentales que les AG sont effectivement

transmis tout au long de la chaîne trophique à l'instar du transfert observé depuis des diatomées jusqu'à des larves de morues en passant par des copépodes (St. John et Lund, 1996), et que la composition en AG des tissus reflète celle des aliments chez diverses espèces de poissons marins (Beckmann et al., 2014, 2013; Regost et al., 2003). Enfin, comme les producteurs primaires synthétisent des AG différents en fonction de leur groupe taxonomique, l'utilisation de ces derniers permet d'évaluer le rôle respectif de différents taxons phytoplanctoniques (p. ex. diatomées *versus* dinoflagellés), macroalgues et bactéries dans la structure de base des réseaux trophiques (Dalsgaard et al., 2003; Kelly et Scheibling, 2012). Les AG ont ainsi permis au cours de plusieurs études de déterminer les ressources trophiques de différentes espèces de poissons au sein d'une communauté marine (Budge et al., 2002; Pethybridge et al., 2011, 2010; Stowasser et al., 2012).

La composition en acides gras a été analysée dans les lipides neutres du foie. Cet organe a été choisi car il est connu pour refléter plus rapidement la composition en AG de l'alimentation que le muscle (Beckmann et al., 2014; Regost et al., 2003). Les lipides neutres ont été sélectionnés car ils sont moins soumis aux régulations métaboliques et se rapprochent donc plus de la composition des proies que les lipides polaires (Koussoroplis et al., 2010). L'analyse des compositions en AG des lipides neutres ont permis, en complément des isotopes stables, de classer les individus en fonction de leur groupe trophique et d'évaluer ainsi la contribution des différents types de proies dans l'exposition trophique aux éléments métalliques, afin de répondre à la problématique (iii).

# Partie

# 1

Les déterminants  
physiologiques de  
l'accumulation des métaux  
par les poissons marins





# Chapitre 1

Rôle des métallothionéines dans les différentes cinétiques d'accumulation du cadmium chez deux espèces de poissons marins

***Gaël Le Croizier, Stéphane Le Floch, Camille Lacroix, Jean Raffray, Sébastien Artigaud, Virginie Penicaud, Valérie Coquillé, Julien Autier, Marie-Laure Rouget, Nicolas Le Bayon, Raymond Laë, Luis Tito De Morais.***

***Soumis à Environmental pollution.***

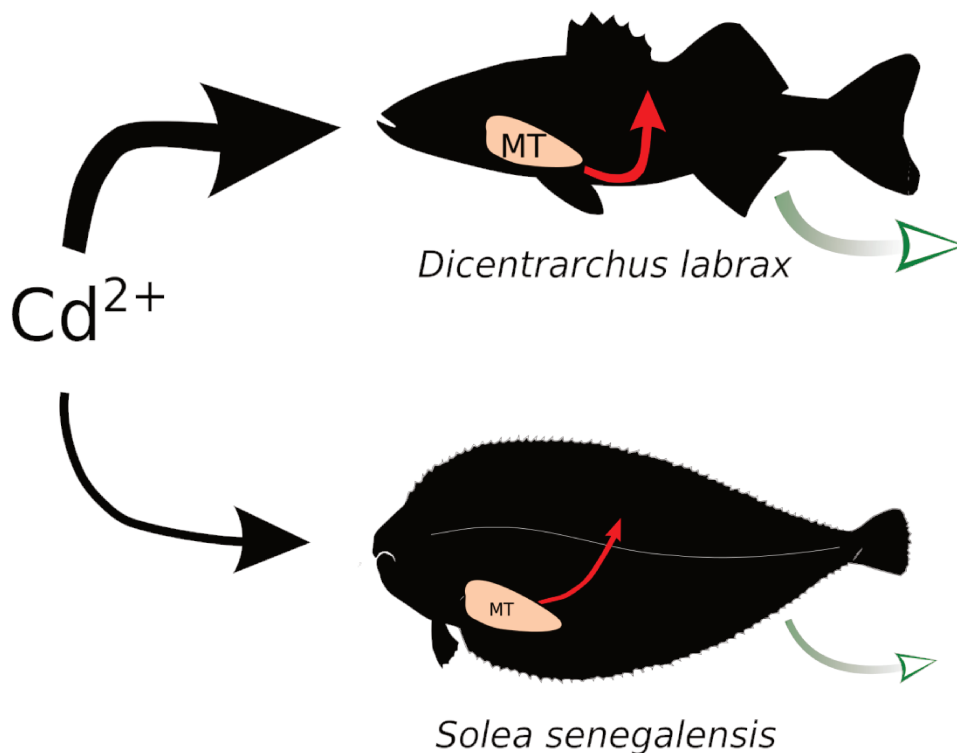
## 1. RESUME

---

Face à l'exposition aux métaux, les différentes espèces de poissons marins présentent des réponses physiologiques contrastées (Fonseca et al., 2011). Parmi ces adaptations, l'un des mécanismes les mieux décrits consiste en l'induction de la synthèse de protéines, les métallothionéines (MT), impliquées dans la séquestration des ions divalents et participants à réduire la toxicité d'éléments tels que le cadmium (Cd). Cette induction conduit à l'observation fréquente d'une corrélation positive entre concentrations en MT et en métaux chez les organismes marins et notamment les poissons (Fernandes et al., 2008, 2007). Récemment, certaines études se sont intéressées à la relation entre les niveaux de MT et les constantes régissant la bioaccumulation des métaux chez les poissons marins (Long et Wang, 2005a, 2005b). Ces auteurs ont montré une augmentation de l'accumulation accompagnée d'une inhibition de l'élimination du Cd lorsque les concentrations en MT augmentent à l'échelle de l'organisme entier. Il est cependant difficile de se prononcer quant au sens d'interaction entre concentrations en MT et en métaux, ces deux paramètres pouvant potentiellement agir l'un sur l'autre. D'autre part, l'utilisation des MT en tant que biomarqueur de contamination métallique est sujette à controverse, de par la réponse de ces protéines à d'autres facteurs environnementaux et endogènes tels que la température, le sexe et l'état de maturation des poissons (Hylland et al., 1998; R. Siscar et al., 2014).

Dans le but d'évaluer la réponse de deux espèces présentes au sein du courant des Canaries et montrant des caractéristiques écologiques et physiologiques contrastées, des juvéniles de bar européen *Dicentrarchus labrax* et de sole sénégalaise *Solea senegalensis* ont été exposés par voie trophique à deux doses de cadmium (3,5 et 22,9 ppm de poids sec) reflétant les concentrations retrouvées dans des proies potentielles de ces espèces en milieu naturel (Bodin et al., 2013; Maanan, 2008; Rouhi et al., 2007). Une exposition chronique de 2 mois par voie trophique a été retenue pour correspondre au mieux à la réalité environnementale (Creighton et Twining, 2010a; Mathews et Fisher, 2009a) et s'est suivie d'une phase de dépuración. Les cinétiques d'accumulation et d'élimination du Cd ont été déterminées dans le foie en tant qu'organe d'accumulation primaire, dans le muscle comme organe d'accumulation secondaire et dans la bile, ce dernier compartiment constituant une voie

d'élimination. Les concentrations en MT ont également été mesurées dans le foie, afin d'évaluer une potentielle induction de leur synthèse, ainsi que leur implication sur la dynamique du Cd entre les différents organes et les conséquences à l'échelle de l'individu. Les résultats obtenus ont permis de montrer une accumulation plus rapide dans le foie du bar comparé à la sole. A partir du foie, le Cd est transporté jusqu'au muscle plus rapidement et en plus grande proportion chez le bar. Enfin, l'excrétion biliaire du métal est également plus importante chez cette espèce en proportion de la quantité de Cd dans le foie. Concernant les MT, l'exposition au Cd n'a globalement pas entraîné de synthèse *de novo* de ces protéines chez ces deux espèces. Toutefois, les concentrations basales en MT sont supérieures chez le bar, quelle que soit la condition expérimentale. Cette étude démontre tout d'abord les limites de l'utilisation des MT en tant que biomarqueur de contamination métallique. Ensuite, elle met en évidence les différences spécifiques de concentrations en MT et leur rôle probable dans l'assimilation et l'excrétion biliaire du Cd, conduisant à la variabilité d'accumulation interspécifique observée *in situ*. Enfin, il semblerait que l'accumulation du Cd dans le muscle dépende de la sollicitation de ce dernier, conduisant aux fortes concentrations en Cd observées chez les espèces à l'activité de nage permanente (Araújo et Cedeño-Macias, 2016; Kojadinovic et al., 2007).





## 2. ARTICLE N° 1

---

# SIGNIFICANCE OF METALLOTHIONEINS IN DIFFERENTIAL METAL ACCUMULATION KINETICS BETWEEN TWO MARINE FISH SPECIES

Gaël Le Croizier<sup>1</sup>, Stéphane Le Floch<sup>2</sup>, Camille Lacroix<sup>2</sup>, Jean Raffray<sup>1</sup>, Sébastien Artigaud<sup>1</sup>,  
Virginie Penicaud<sup>1</sup>, Valérie Coquillé<sup>1</sup>, Julien Autier<sup>1</sup>, Marie-Laure Rouget<sup>3</sup>, Nicolas Le Bayon<sup>5</sup>,  
Raymond Laë<sup>1</sup>, Luis Tito De Morais<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/IFREMER,  
BP 70, 29280 Plouzané, France

<sup>2</sup>Centre of Documentation, Research and Experimentation on Accidental Water Pollution (CEDRE),  
715 rue Alain Colas, CS 41836, Brest 29218-Cedex 2, France

<sup>3</sup>Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), Université de Bretagne Occidentale (UBO), CNRS  
UMS 3113, 29280 Plouzané, France

<sup>5</sup>Ifremer, Unité de Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins, LEMAR UMR 6539, Ifremer,  
Centre de Brest, Laboratoire PFOM/ARN, BP 70, 29280 Plouzané, France

## Abstract

Impacted marine environments lead to metal accumulation in edible marine fish, ultimately impairing human health. Nevertheless, metal accumulation is highly variable among marine fish species. In addition to ecological features, bioaccumulation differences can be attributed to species-related physiological processes, which were investigated in two marine fish present in the Canary Current Large Marine Ecosystem (CCLME), where natural and anthropogenic metal exposure occurs. The European sea bass *Dicentrarchus labrax* and Senegalese sole *Solea senegalensis* were exposed for two months to two environmentally realistic dietary cadmium (Cd) doses before a depuration period. Organotropism (*i.e.*, Cd repartition between organs) was studied in two storage compartments (the liver and muscle) and in an excretion vector (bile). To better understand the importance of physiological factors, the significance of hepatic metallothionein (MT) concentrations in accumulation and elimination kinetics in the two species was explored. Accumulation was faster in the sea bass muscle and liver, as inferred by earlier Cd increase and a higher uptake rate. The elimination efficiency was also higher in the sea bass liver compared to sole, as highlighted by greater biliary excretion. In the liver, no induction of MT synthesis was attributed to metal exposure, challenging the relevance of MT use as a biomarker of contamination. However, the basal MT pools were always greater in the liver of sea bass than in sole. This species-specific characteristic might have enhanced Cd biliary elimination and relocation to other organs like muscle through the formation of more Cd/MT complexes. Thus, MT basal concentrations seem to play a key role in the variability observed in terms of metal concentrations in marine fish species.

**Keywords** cadmium, trace element, *Dicentrarchus labrax*, *Solea senegalensis*, chronic dietary exposure





## Highlights

- Environmentally realistic trophic Cd doses led to accumulation in edible marine fish
- Faster accumulation occurred in sea bass liver compared to sole
- Muscular Cd accumulation was higher in sea bass due to its swimming behaviour
- MT concentrations failed to reflect Cd exposure in both species
- Species-specific basal MT pools seemed to influence Cd uptake and biliary excretion

## Introduction

Contamination by heavy metals is a major problem that marine ecosystems have to face because they can be toxic even at very low concentrations. These inorganic elements are produced from natural processes, such as volcanic eruptions and natural crust erosion, but they can also result from anthropogenic inputs. This is the case for cadmium (Cd), which is a common by-product of the mining industry and can be released at high amounts into the marine environment in some regions (World Health Organization, 2010). More precisely, it is estimated that one-third of the unintentional release of Cd is from the production and use of phosphate fertilizers (McGeer et al., 2011). Coastal regions in West Africa, which belong to the Canary Current Large Marine Ecosystem (CCLME), are therefore particularly subjected to Cd residue due to the direct release of phosphogypsum into water by the phosphate industry (Gaudry et al., 2007). In addition to natural enrichment due to hydrodynamic processes, such as upwelling, this important source of dissolved Cd (e.g., estimated at 240 t Cd·yr<sup>-1</sup> off the coast of Morocco) leads to strong uptake by phytoplankton communities in this region (Auger et al., 2015). Along with this direct accumulation by phytoplankton, bioaccumulation at higher trophic levels, such as fish, mainly occurs through dietary pathways (Mathews and Fisher, 2009; Creighton and Twining, 2010) and can lead to significant accumulation in the organs of fish from this region (El Morhit et al., 2013).

Among the different fish species, great variability in terms of metal accumulation is observed, resulting from different habitat occupation (Goutte et al., 2015) and/or different feeding habits (Le Croizier et al., 2016; Metian et al., 2013). This variability has also been observed between the CCLME species in different countries, such as Morocco (Chahid et al., 2014), Mauritania (Roméo et al., 1999; Sidoumou et al., 2005) or Senegal (Diop et al., 2016; Diop and Amara, 2016). However, these parameters may not be sufficient to explain the observed variability since species from the same habitat (Barhoumi et al., 2009; Siscar et al., 2013), or those that share the same trophic niche (Kiszka et al., 2015), can also present different amounts of accumulated metals. Therefore, there is a need to conduct experimental studies to free bioaccumulation measurements from ecological parameters. Under experimental conditions, accumulation may vary under environmental parameters, such as the food composition (Wang et al., 2012), temperature and salinity of water (Guinot

et al., 2012; Zhang and Wang, 2007a) and duration and concentration of metal exposure (Berntssen et al., 2001; Long and Wang, 2005b), making comparisons between species difficult from one study to another. Relatively few authors have investigated the metal accumulation of different marine fish species exposed the same conditions. It was however shown that the interspecific variability that was observed *in situ* also occurred in controlled conditions (Jeffrey et al., 2006; Kalman et al., 2010; Mathews et al., 2008).

Metals can take several months to accumulate, which implies the necessity of studying bioaccumulation over several months. Moreover, the metal concentration will vary depending on the organ considered. Following dietary exposure, the Cd concentration in fish will generally follow this repartition: intestine > liver  $\approx$  kidney > gills > muscle (Berntssen et al., 2001; Kim et al., 2006). Once ingested, Cd uptake occurs in intestinal tissue through membrane transporters, via channels for calcium or essential metals. Dietary accumulation thus first takes place in the digestive tract. After reaching the liver, Cd is released into general blood circulation and finally attains secondary accumulation in organs, such as muscle. In fish, Cd is known to have a long biological half-life (e.g., more than a year in the liver and kidney in rainbow trout; Haux and Larsson, 1984), reflecting the poor efficiency of excretion pathways. Internal Cd depuration mainly occurs through urine production from the kidney and bile excretion from the liver to intestine and is finally eliminated with faeces (McGeer et al., 2011). Some authors have investigated Cd elimination, and differences were found between species (Mathews et al., 2008).

Cd toxicity is responsible for numerous impairments in organisms, such as oxidative damage, endocrine and ionoregulation disruption, histopathology and depression of the immune system, which can ultimately affect growth and survival (McGeer et al., 2011). Numerous physiological mechanisms are able to prevent this toxicity in fish. Among them, metallothioneins (MT) are one of the most well-known and described as well as one of the most ubiquitous mechanisms in the animal kingdom (Adam et al., 2010). MT are a group of low molecular weight (approximately 6 kDa in fish) cytosolic proteins that are involved in metal sequestration. One of their main characteristics is the presence of a large number of free thiol groups that are able to bind to divalent cations. The formation of this complex prevents Cd from remaining as a free ion, its most toxic form. MT are inducible in fish after

metal exposure (Cheung et al., 2004; George et al., 1996); however, many experimental studies have used much higher concentrations than those found in the marine environment. *In situ* studies have shown positive correlations between Cd and MT concentrations, suggesting a strong relationship between the MT concentration and bioaccumulation for some fish (Fernandes et al., 2007, 2008). However, this relationship is highly species-specific since some fish present a high Cd concentration alongside low MT concentrations (Rosario Siscar et al., 2014).

The goal of our experiments was to compare Cd accumulation and elimination between two different marine fish species that are naturally present in the CCLME to better understand the variability of bioaccumulation within this Cd-exposed ecosystem. The European sea bass *Dicentrarchus labrax* is a demersal fish that is widely distributed in the Northeast Atlantic from the coasts of Norway to Morocco. This species inhabits estuaries, lagoons and coastal waters and displays a carnivorous diet that is composed of fish, crustaceans and cephalopods (López et al., 2015). On the other hand, the Senegalese sole *Solea senegalensis* is a benthic flatfish that is distributed from the Gulf of Biscay to the coasts of Senegal and also inhabits coastal waters and riverine estuaries. Due to its close association with the bottom, this species mainly feeds on benthic invertebrates, including crustaceans, polychaetes and bivalves (Teixeira and Cabral, 2010). In this study, fish were dietarily exposed to environmentally realistic Cd concentrations (inferior to 25 ppm) based on previously reported levels in potential prey from the CCLME (Bodin et al., 2013; Maanan, 2008). We investigated Cd repartition between different organs: one of primary accumulation (liver), one of secondary accumulation (muscle) and a marker of excretion (bile). Since these two species can exhibit different biomarker responses to metallic contamination (Fonseca et al., 2011), we examined the possible induction of MT synthesis in the liver due to Cd exposure. Finally, we sought to explore the significance of the liver MT concentrations in regard to the accumulation and elimination kinetics of the two species.

## Materials and methods

### Fish and experimental procedures

All animal procedures were in accordance with the French and EU guidelines for animal research (project approval number: 03266.03).

Immature sea bass *Dicentrarchus labrax* used in this experiment were obtained from a commercial hatchery (Aquastream, Ploemeur, France), whereas immature Senegalese sole *Solea senegalensis* were provided from a marine farm (Ferme marine de l'Adour, Anglet, France). The fish were transported to the CEDRE (Centre of Documentation, Research and Experimentation on Accidental Water Pollution, Brest, France). After receiving anaesthesia by bathing in a 0.05 ml/L solution of tricaine methanesulfonate (MS-222) (Ackerman et al., 2005), each fish was randomly assigned to one of twelve high density polyethylene tanks that had a 300 L volume (six tanks for each species, 40 sole and 50 sea bass per tank to ensure equivalent biomass) at the Cedre's marine animal facility. This facility is an independent greenhouse that is submitted to a natural photoperiod and supplied with a continuous seawater flow from the bay of Brest. The temperatures in the experimental tanks followed the outdoor temperature.

Fish were first acclimated to the experimental conditions for one month, during which they were fed daily with dried commercial pellets (Turbot label rouge 1.4 mm, Le Gouessant Aquaculture).

To obtain a low Cd ( $3.5 \pm 0.2$  ppm dw) or high Cd ( $22.9 \pm 0.3$  ppm dw) concentration in fish food, the commercial pellets were spiked with a 10 mg/L or 100 mg/L Cd (as CdCl<sub>2</sub> in milliQ water) solution for 30 min. The diet was then placed at -20 °C, freeze dried and broken into small pellets before usage. The control diet was prepared in the same way, but with the addition of milliQ water only, where the measured background Cd level was  $0.71 \pm 0.00$  ppm dw.

For each of the four conditions (*i.e.*, Cd-exposed and control fish, for both species) there were three replicate tanks, and due to space limitations, the two experiments (*i.e.*, low and high Cd exposure) were conducted separately. Low Cd exposure (hereafter experiment one) started first during summer 2014, whereas high Cd exposure (experiment two) started during summer 2015.

Dietary Cd exposure was initiated by randomly assigning three of the six tanks per species to Cd-enriched food. The six remaining tanks were fed the control diet. Cd exposure was conducted for 60 days for the two Cd concentrations, after which a depuration period was conducted that lasted for 30 days for the low Cd concentration (first experiment) and 60 days for the high Cd concentration (second experiment). During the depuration period, all of the tanks were fed the control diet.

Daily food distribution was performed slowly and continuously over 24 h with a clockwork feeder (COFA, Paris, France) to prevent pellets from remaining in the tank and thus avoid Cd desorption in water. Sea bass were fed at 1.7 % body weight while sole were fed at 1 % body weight per day to meet the physiological requirements of each species (Danion et al., 2011; Salas-Leiton et al., 2010). Despite differential food intake, Cd input was similar for both species relative to the liver weight (Table 1), which is the first organ of accumulation following dietary ingestion. Fish were fasted for 48 h prior to each sampling to ensure the production of a sufficient bile volume. The bottom of each tank was siphoned every day to avoid Cd leaching from faeces.

Species	Cf (ppm)	Length (cm)	Weight (g)	FI (% bw)	HSI (% bw)	Cd body (ppm)	Cd liver (ppm)
Sea bass	3.5	14.2 ± 0.8	27.9 ± 4.5	1.7	1.2 ± 0.2	0.06	5.0
Sole		14.7 ± 1.4	33.9 ± 10.6	1.0	1.0 ± 0.2	0.04	3.6
Sea bass	22.9	14.1 ± 0.7	29.8 ± 4.5	1.7	1.4 ± 0.4	0.38	27.4
Sole		14.9 ± 1.1	36.4 ± 7.9	1.0	0.8 ± 0.2	0.24	29.5

**Table 4 Food input regarding to biomass. Cf: Cd concentration in food (ppm dw); Length at To; Weight at To; FI: daily food intake (% body weight · day<sup>-1</sup>); HSI: hepatosomatic index (% body weight at To); Cd body: daily Cd input per body weight (µg Cd · g body<sup>-1</sup> · day<sup>-1</sup>); Cd liver: daily Cd input per liver weight (µg Cd · g liver<sup>-1</sup> · day<sup>-1</sup>).**

### Monitoring and biological sampling

Physico-chemical parameters (O<sub>2</sub>, pH, temperature, salinity) and water quality (nitrates, nitrites) were measured every ten days. During the first experiment (low Cd dose), the water temperature decreased from 19.8 to 12.7 °C, oxygen saturation increased from 76.3 % to 88.6 %, pH increased from 7.8 to 8.1 and salinity increased from 34.9 to 35.6. During

experiment two (high Cd dose), the water temperature decreased from 20.7 to 12.8 °C, oxygen saturation increased from 81.2 % to 98.2 %, pH increased from 8.0 to 8.2 and salinity increased from 35.2 to 35.7. The water was free of nitrate and nitrite (Colorimetric test JBL) in both experiments.

Prior to initiating the dietary exposure treatment (T0), three fish per tank (nine for each condition) were anesthetized by bathing in a 0.05 ml/L solution of MS-222 before being euthanized by bathing in a 0.2 ml/L solution of MS-222. They were then dissected with ceramic tools to avoid metal contamination. The liver, gallbladder and a piece of dorsal muscle (a standardized cut on the dorsal muscle) were collected. The liver was split into two samples, one for Cd analysis and one for metallothionein analysis, while other tissues were used for Cd analysis only. Samples were put in acid-washed (10 % HNO<sub>3</sub>) individual plastic microcentrifuge tubes, flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until further analysis. The same sampling was performed after 10 (T10), 30 (T30) and 60 (T60) days of exposure. During the depuration period, the same was done after 10 (T70), 20 (T80) and 30 (T90) days for experiment one, as well as after 40 (T100), 50 (T110) and 60 (T120) days for experiment two.

### **Cadmium analysis**

Liver samples for cadmium analysis were freeze-dried, ground, and stored in individual acid-washed plastic microcentrifuge tubes. Three liver samples of fish from the same tank were pooled to obtain approximately 90 mg of dried sample, and they were digested in a mixture of 7 ml of 70 % HNO<sub>3</sub> and 1 ml of 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (both of ultrapure quality) in Teflon vessels. Mineralization was performed in a microwave oven (Ethos One, Milestone) for 15 min with increasing temperature until reaching 200 °C, followed by 15 min at 200 °C (1500 W) and 90 min of cooling. The samples were then evaporated on a hotplate at 100 °C, resolubilized with 2 ml of HNO<sub>3</sub>, and diluted to 50 ml with Milli-Q quality water (Merck Millipore). Because Cd levels are known to be lower in muscle tissues (Berntssen et al., 2001; Kim et al., 2006), the same procedure that was used for the liver was followed, but samples were pooled to obtain approximately 210 mg. For bile, the content of three gallbladders of individuals from the same tank were pooled to obtain approximately 150 mg of wet sample.

Cadmium was analysed using an ICP Q-MS (X Series 2, Thermo Scientific) at the Pôle de Spectrométrie Océan (PSO, Plouzané, France) with an internal standard solution of rhodium. Reference materials (fish protein DORM-4 and lobster hepato-pancreas TORT-2, NRCC) were treated and analysed in the same way as samples. The results for the reference materials displayed mean cadmium recoveries of  $97 \pm 16$  % for DORM-4 and  $99 \pm 15$  % for TORT-2. Blanks were included in each analytical batch. The concentrations in the liver (ppm), as well as in muscle (ppb), are provided on a dry weight basis ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw and  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  dw, respectively), while those in bile (ppb) are expressed on a wet weight basis ( $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  ww). The detection limit ( $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  dw) was 0.2 for cadmium.

### **Metallothionein analysis**

Analysis of metallothionein was performed on liver tissues, generally following the procedures described by Tenório-Daussat et al., 2014. Individual liver samples (approximately 200 mg) were homogenized in a solution (250  $\mu\text{L}$  for the sole and 500  $\mu\text{L}$  for sea bass) containing Tris-HCl 20 mM pH 8.6, 0.01 % DTT (dithiothreitol) as a reducing agent and 1 % antiproteolytic agent (Protease Inhibitor Mix, GE Healthcare). Samples were then centrifuged at  $20,000 \times g$  for 1 h at 4 °C. Ten microlitres of supernatant was then separated from the pellet and heated at 70 °C for 10 min. Another centrifugation step was conducted at  $20,000 \times g$  for 30 min at 4 °C. The final supernatant containing MT was separated and frozen at -80 °C until analysis. The MT concentration was determined by spectrophotometry (Ellman's reaction), in which the sample absorbance was evaluated at 412 nm using a microplate reader spectrophotometer (POLARstar Omega, BMG LABTECH). Concentrations were estimated by using reduced glutathione (GSH) as an external standard. Ellman's reaction colours thiol groups, and since reduced GSH includes one thiol and MT from sea bass and sole includes 20 thiols, the MT content was calculated by using the relationship of 20 mol reduced GSH = 1 mol MT. Finally, the MT concentration (ppm) was expressed on a dry weight basis ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw) using the referenced molecular weight of sea bass MT (5992 Da; NCBI accession number: AAF22355) and sole MT (6051 Da; NCBI accession number: ADF42597).



## Data analysis

Kinetic constants were calculated as the slope of the regression line of the Cd concentration over time. An uptake rate ( $K_u$ ) was inferred for the two species when at least two sample points were significantly higher in exposed fish compared to control ones during the exposure period (*i.e.*, for liver concentrations between T0 and T60 in both experiments). An efflux rate ( $K_e$ )

was calculated when a significant decrease of the Cd levels occurred during the depuration period (*i.e.*, in the liver for the highest exposure dose). The proportion of hepatic cadmium transported to muscle or excreted through bile was defined as the percentage of the ratio of the liver Cd concentration to the muscle or bile Cd concentration, calculated during the entire experiment. All of the data submitted to the statistical tests were first checked for normality (Shapiro-Wilks test) and homogeneity of variance (Bartlett test). When these conditions were verified, raw data were used; otherwise, they were transformed with a log function. One-way ANOVAs followed by Tukey's HSD tests were performed to test differences between groups. Analysis of covariance, ANCOVA, was used to compare the uptake rates of the two species. All of the statistical analyses were performed using the free software R (R Core Team, 2016). Comparison of the MT (isoform 1) amino acid sequences of *D. labrax* and *S. senegalensis* was performed using the NCBI database.

## Results

### Cadmium kinetics

#### Muscle

During experiment one (3.5 ppm exposure), the Cd concentrations in the muscle of exposed sea bass were significantly higher compared to those of control fish after T30 (ANOVA;  $p < 0.05$ ) and reached  $8.2 \pm 2.9$  ppb dw after 60 days (Fig. 1A). During the depuration period, the Cd concentrations remained similar to those of the exposure period, even after 30 days of depuration (T90), when the Cd level was  $10.5 \pm 1.4$  ppb dw in *D. labrax*. The accumulation pattern in Senegalese sole muscle was quite different (Fig. 1B). The Cd amounts were

significantly higher in exposed fish compared to control fish only at the end of the 60 day exposure period (ANOVA;  $p < 0.05$ ), with a mean of  $8.3 \pm 4.0$  ppb dw.

In the second experiment (22.9 ppm exposure), muscle of exposed sea bass showed higher Cd concentrations compared to those of the control after 10 days and throughout the experiment (ANOVA;  $p < 0.001$ ), reaching  $91.2 \pm 76.4$  ppb dw (*i.e.*, 18.2 ppb ww) at T60 (Fig. 1C). Within exposed sea bass, the Cd levels were also always higher than that at T0 (ANOVA;  $p < 0.05$ ), but did not vary following exposure. In sole muscle, the Cd amounts were higher in exposed fish compared to control fish from T60 to T120 (ANOVA;  $p < 0.05$ ), with a maximum mean of  $31.7 \pm 35.8$  ppb dw (*i.e.*, 6.3 ppb ww) at T60, but neither varied during this period within exposed fish (Fig. 1D).

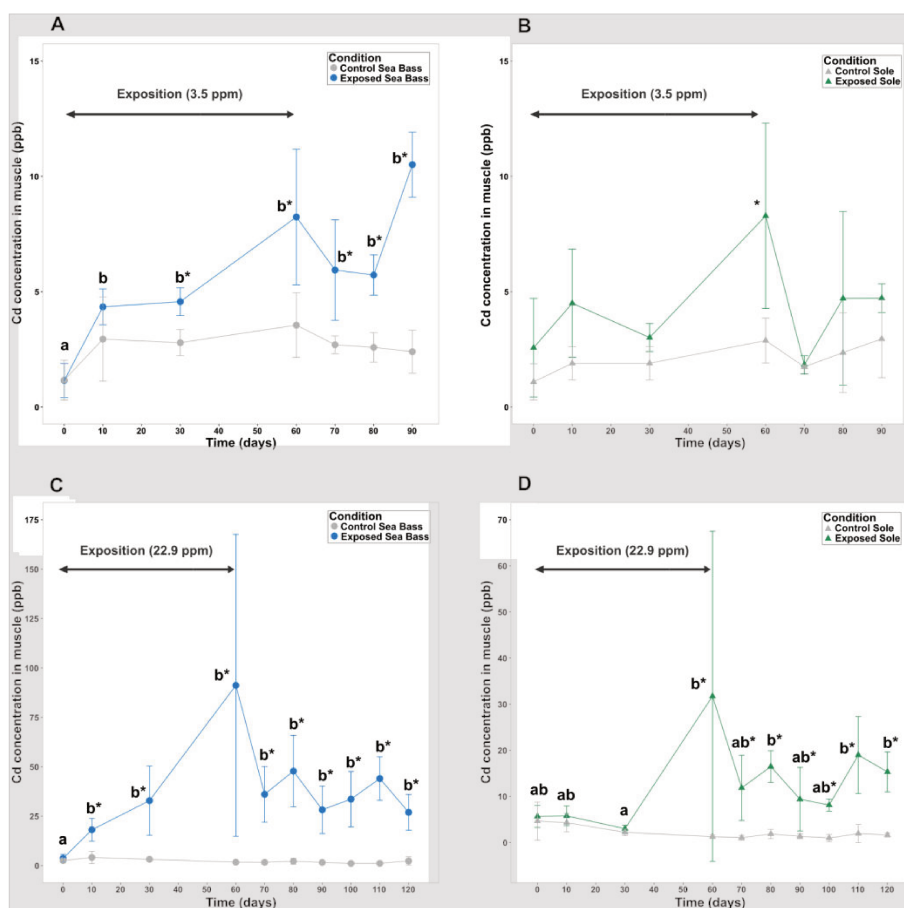


Figure 13 Cd concentrations (mean  $\pm$  standard deviation;  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  dry wt) in the muscle of the Sea bass (blue) and the Sole (green) during experiment one (3.5 ppm Cd exposure; A and B) and experiment two (22.9 ppm Cd exposure; C and D). Different letters indicate significant differences over time among exposed fish (ANOVAs followed by Tukey's HSD tests). "\*" indicates significant differences between exposed and control fish for a same sampling point (ANOVAs).

## Liver

Following 3.5 ppm exposure, the Cd concentrations in the sea bass liver were significantly higher in exposed fish compared to control fish from T30 to T90 (ANOVA;  $p < 0.05$ ) (Fig. 2A). Within exposed sea bass, the Cd concentrations from T30 to T90 were higher than at T0 and T30 (ANOVA;  $p < 0.001$ ) and reached  $3.6 \pm 1.5$  ppm. In the sole liver, the Cd concentrations were significantly higher in exposed fish compared to control fish from T30 to T90 (ANOVA;  $p < 0.05$ ) (Fig. 2B). Within exposed sole, the Cd concentrations at T30, T60, T80 and T90 were higher than at T0 (ANOVA;  $p < 0.05$ ) and reached  $4.4 \pm 1.2$  ppm. During the depuration period, a significant decrease occurred from T60 to T70.

Following 23.9 ppm exposure, the Cd kinetics in the liver showed the same pattern in the two species, although the Cd levels in exposed fish were significantly higher than in control fish earlier in sea bass (*i.e.*, after 10 days of exposure) than in Senegalese sole (*i.e.*, after 30 days of exposure) (ANOVA;  $p < 0.001$ ) (Fig. 2C, 2D). For both species, after 60 days of exposure (T60) and after T30 for sea bass, the Cd concentrations in the liver were significantly higher than those at T0 and T10 (ANOVA;  $p < 0.001$ ). Then, the Cd levels increased until T70 (*i.e.*, 10 days after the end of exposure), when they significantly differed from those at T30 (ANOVA;  $p < 0.05$ ), reaching  $20.2 \pm 9.7$  ppm dw for sea bass and  $17.2 \pm 1.7$  ppm dw for Senegalese sole. During the elimination period, the Cd concentrations remained similar and only differed from T70 after 60 days of depuration (T120) in both species (ANOVA;  $p < 0.05$ ).

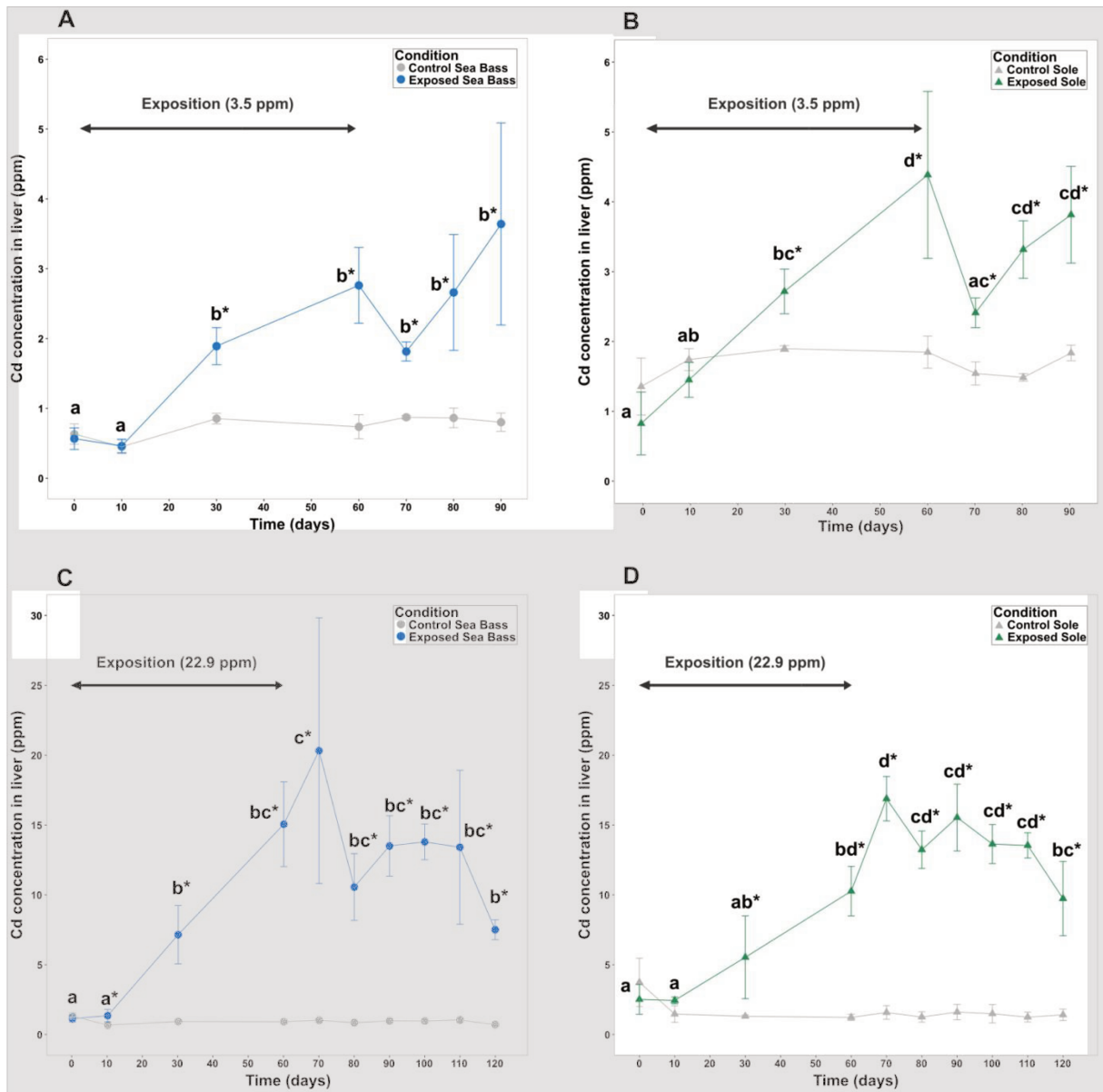


Figure 14 Cd concentrations (mean  $\pm$  standard deviation;  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dry wt) in the liver of the Sea bass (blue) and the Sole (green) during experiment one (3.5 ppm Cd exposure; A and B) and experiment two (22.9 ppm Cd exposure; C and D). Different letters indicate significant differences over time among exposed fish (ANOVAs followed by Tukey's HSD tests). "\*" indicates significant differences between exposed and control fish for a same sampling point (ANOVAs).

Cd accumulation was linear over time in the liver for both species regardless of exposure dose. The uptake rate ( $K_u$ ) increased with the exposure dose for both species (ANCOVA,  $p < 0.01$ ) (Table 2).  $K_u$  was similar in the two species for the low exposure dose, whereas for the highest dose, it was superior in sea bass compared to sole ( $K_u = 0.24$  and  $0.13$ , respectively, ANCOVA,  $p < 0.01$ ) (Fig. 3).

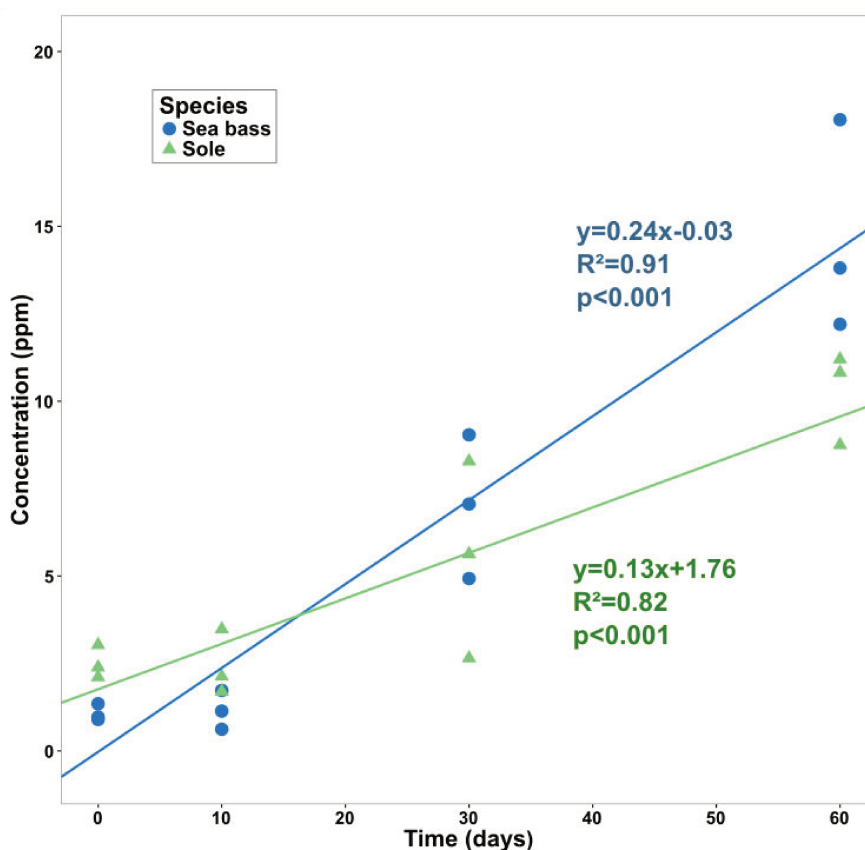


Figure 15 Cd concentrations ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dry wt) in the liver of the Sea bass and the Sole during 60 days of exposition to 22.9 ppm of Cd. Slopes of the linear regression curves represent the uptake rate ( $K_u$ ).

The Cd concentrations over the depuration time were not linear and thus poorly fitted a linear regression, even after log-transformation of the raw values ( $R^2<0.31$ , not shown). Calculation of the efflux rate ( $K_e$ ) was therefore considered to not be relevant. However, the elimination rate (%) was used as a percentage decrease of the initial value (after 70 days). The proportion of removed Cd did not significantly differ between species (Table 2).

	3.5 ppm exposure					22.9 ppm exposure					
	Muscle	Liver	Bile	MT	Ku	Muscle	Liver	Bile	MT	Ku	Loss
<b>Sea bass</b>	Accum	Accum	Accum	No	0.06 <sup>a</sup>	Accum	Accum/Elim	Accum	No	0.24 <sup>b*</sup>	59 ± 16
<b>Sole</b>	Accum	Accum/Release	No	No	0.04 <sup>a</sup>	Accum	Accum/Elim	Accum	Induction	0.13 <sup>b</sup>	39 ± 23

Table 5 Synthesis of the results obtained in the Sea bass and the Senegalese sole after exposition to two dietary Cd concentrations. “Accum” indicates a higher level of Cd in exposed fish than in controls for at least one sampling point. “Release” indicates a loss in hepatic Cd before a further increase during depuration period. “Elim” indicates a loss in hepatic Cd at the end of the depuration period. “Induction” indicates a de novo synthesis of metallothioneins (MT) due to Cd exposition. “K<sub>u</sub>” is the uptake rate in the liver. “Loss” represents the proportion of eliminated hepatic Cd at the end of the depuration period compared to T70 (mean ± standard deviation; %). Different letters indicate significant differences over experiments among exposed fish of a same species, “\*” indicates a significant difference between species within a same experiment (ANCOVA). “No” indicates no accumulation nor induction.

### Bile

During experiment one (3.5 ppm exposure), the Cd concentrations measured in bile were only significantly higher in exposed sea bass compared to control fish (ANOVA, p<0.001) at the end of the depuration period (T90), when they reached 73.7 ± 2.1 ppb ww (Fig. 3A). No differences between exposed and control fish were found for Senegalese sole (Fig. 3B).

In experiment two (22.9 ppm exposure), for both species, the Cd levels in bile were higher in exposed fish compared to control fish (ANOVA, p<0.05 for sea bass and p<0.01 for sole) from 30 days of exposure to the end of the depuration period (T120), but no variation was found within exposed fish during this period (Fig. 3C, 3D). The maximum Cd amounts in bile were found at the end of the exposure period (T60), up to 117.2 ± 64.3 and 95.1 ± 56.5 ppb ww for sea bass and sole, respectively.

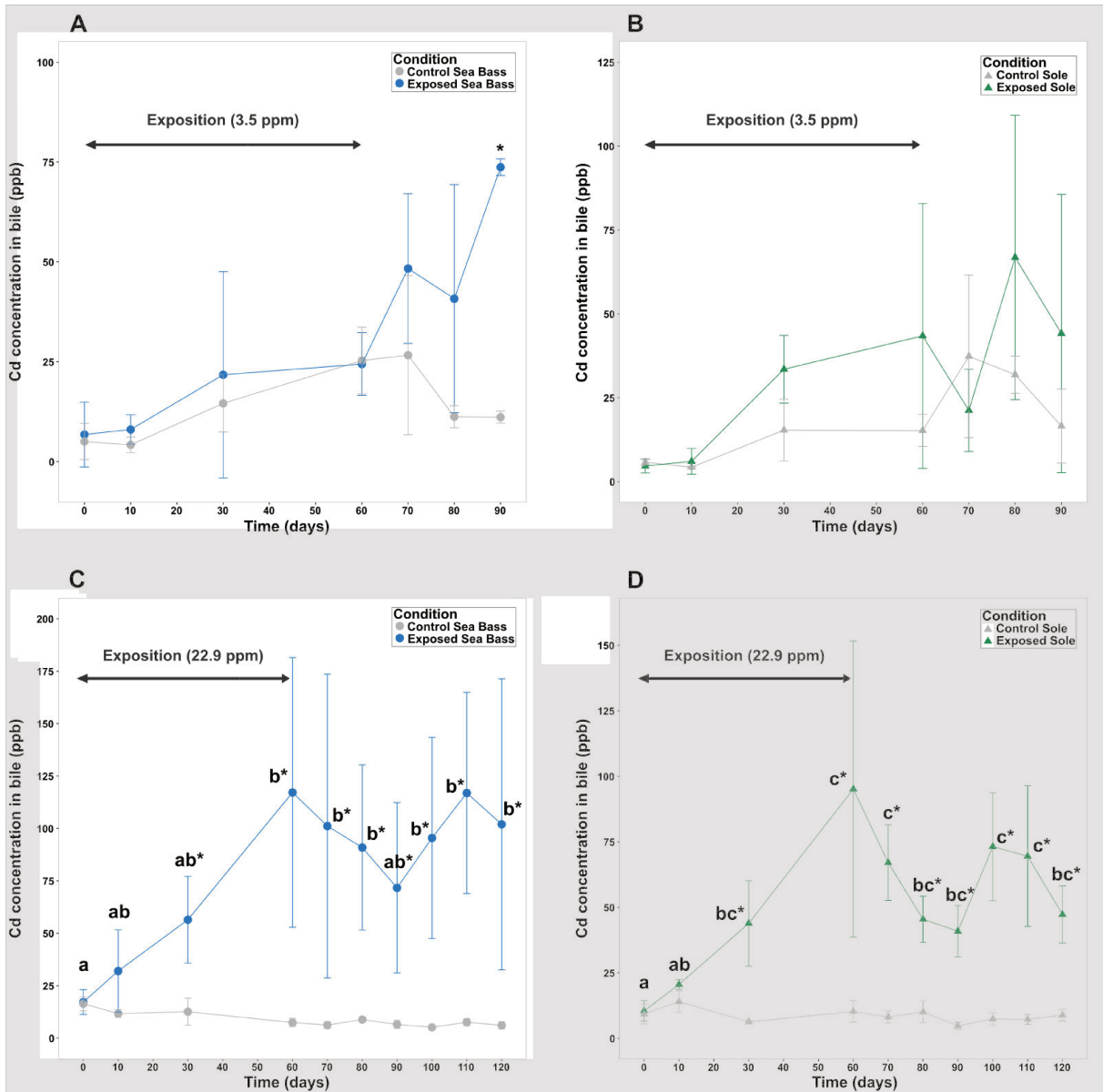


Figure 16 Cd concentrations (mean  $\pm$  standard deviation;  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  dry wt) in the bile of the Sea bass (blue) and the Sole (green) during experiment one (3.5 ppm Cd exposure; A and B) and experiment two (22.9 ppm Cd exposure; C and D). Different letters indicate significant differences over time among exposed fish (ANOVAs followed by Tukey's HSD tests). "\*" indicates significant differences between exposed and control fish for a same sampling point (ANOVAs).

### Organotropism

The Cd concentrations were always higher in the liver than in the muscle or bile of the two species in both experiments (ANOVA,  $p < 0.001$ ). A higher proportion of hepatic Cd was

transported to sea bass muscle compared to sole muscle for both experiments, while a higher proportion of hepatic Cd was excreted through sea bass bile only in experiment two (Fig. 4).

For sole, accumulation in exposed fish compared to control fish occurred earlier in the liver (from T30) than in muscle (at/from T60) in both experiments. In sea bass, accumulation in the two organs occurred simultaneously for the two exposure doses.

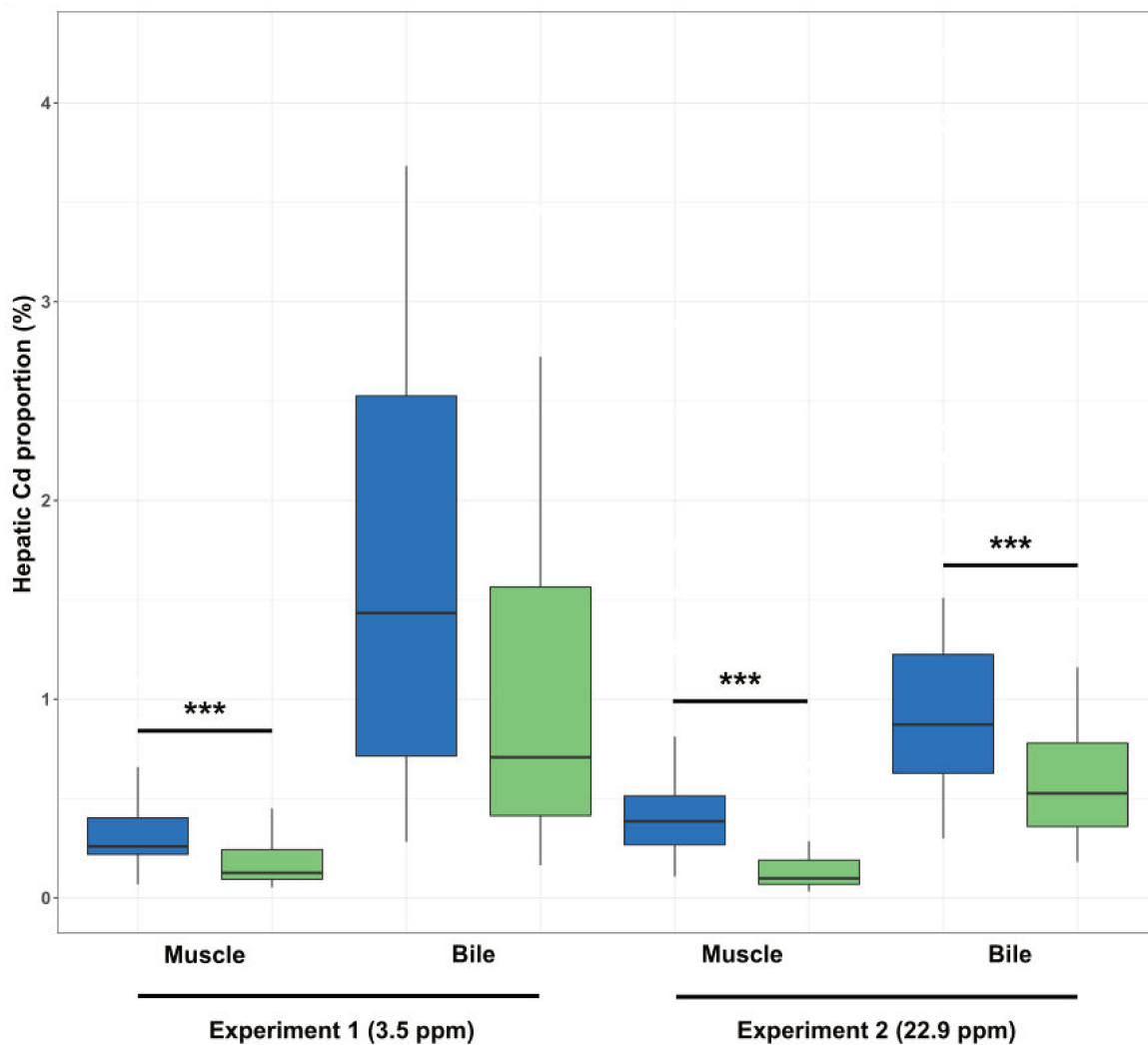


Figure 17 Proportion of hepatic Cadmium transported to muscle or excreted through bile (*i.e.* percentage of the ratio of liver Cd concentration on muscle or bile Cd concentration) calculated during the entire experiment. The upper and lower hinges represent the quartiles, the vertical lines, the maximum and minimum data values and the bold line represents the median value. Values are shown for the Sea bass (blue) and the Sole (green) during the two experiments. “\*” indicates significant differences between exposed and control fish for a same sampling point (ANOVAs).



## Metallothioneins

During experiment one (3.5 ppm Cd exposure), no difference in the MT concentration was observed in the liver of exposed fish compared to control fish for either species (Fig. 5A). In the meantime, the MT amounts in sea bass were always higher than those in Senegalese sole, whatever the condition, *i.e.*, control or exposed fish (ANOVA,  $p < 0.001$ ). The MT concentrations changed over time for both species, but were more variable for sea bass. In sea bass, the concentrations ranged from  $157.0 \pm 37.2$  to  $342.5 \pm 57.7$  ppm dw, whereas in Senegalese sole, they were between  $30.3 \pm 12.1$  and  $104.9 \pm 53.0$  ppm dw.

During experiment two (23.9 ppm Cd exposure), induction of MT synthesis, *i.e.*, a significant difference in the MT concentration between exposed and control fish, was only observed in *S. senegalensis* at T80 and T90 (ANOVA,  $p < 0.05$ ) (Fig. 5B).

Similarly, as in experiment one, the MT levels were generally higher in sea bass liver than in Senegalese sole liver (ANOVA,  $p < 0.001$ ) except at T0 and T10. At T0, no differences were observed between species. At T10, the MT levels were higher in control sea bass (ANOVA,  $p < 0.01$ ) and in exposed sea bass (ANOVA,  $p < 0.05$ ) compared to control sole only. The MT levels varied over time for both species, but fluctuated much more for sea bass, from  $141.6 \pm 53.0$  to  $325.8 \pm 96.0$  ppm dw, and from  $58.5 \pm 20.1$  to  $134.1 \pm 34.3$  ppm dw in Senegalese sole.

Finally, it should be noted that in the 60 amino acid sequence of the MT from *D. labrax* and *S. senegalensis*, 7 differences were found, including one major modification in the 34<sup>th</sup> amino acid (serine/proline).

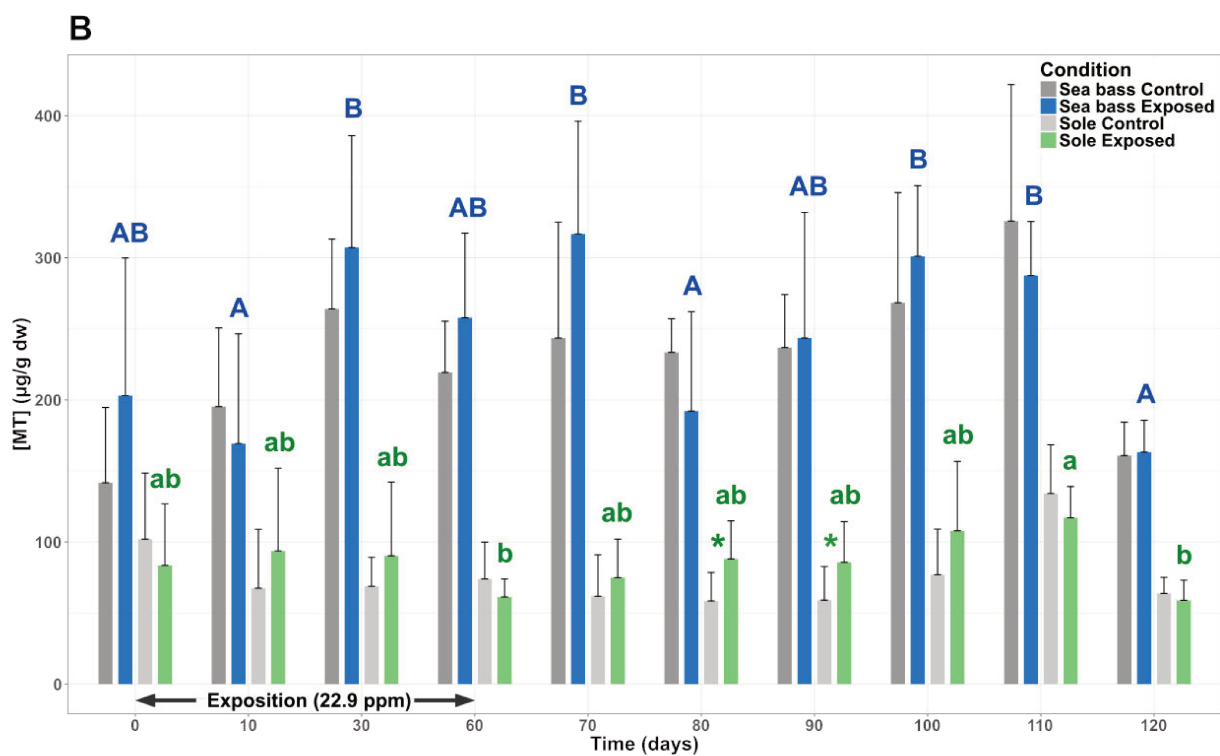
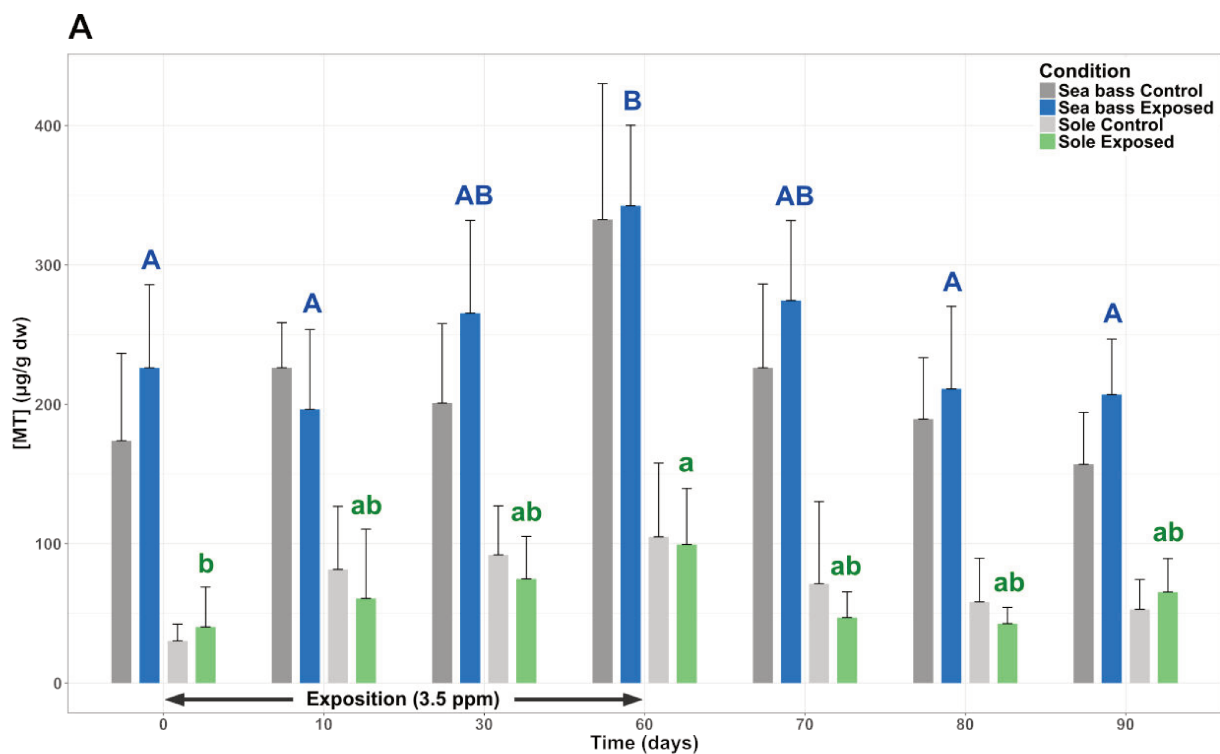


Figure 18 Metallothionein concentrations (mean  $\pm$  standard deviation;  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dry wt) in the Sea bass and the Sole liver during experiment one (3.5 Cd exposure; upper figure) and experiment two (22.9 ppm exposure; lower figure). Different letters indicate significant differences over time among exposed fish of a same species; "\*" indicates significant differences between control and exposed fish of a same species; MT concentrations were always higher in Sea bass than in Sole regardless of time and condition except at T0 and T10 during experiment two (ANOVAs followed by Tukey's HSD tests).

## Discussion

The goal of our experiments was to compare Cd accumulation and elimination between two different marine fish species that are naturally found in the CCLME to better understand the bioaccumulation variability within this Cd-exposed ecosystem.

### **Environmental relevance of the measured Cadmium and Metallothioneins concentrations**

The bioaccumulated Cd concentrations found for both species in the present study were generally in the same order of magnitude as those observed *in situ*, supporting the environmental relevance of the exposure doses and duration used, although a few differences were observed. For instance, although the Cd levels in sea bass muscle were similar, the experimentally obtained concentrations in the liver were always above those found in the field (Table 3). As organotropism (*i.e.*, metal repartition between organs) was shown to depend on the route of exposure (Chowdhury et al., 2005), the differences observed between field studies and our experimental conditions might be reflective of the greater diversity in the exposure pathways found in the natural environment. It is of interest to note that the maximum Cd levels that bioaccumulated in muscle (0.006 and 0.018 ppm ww for sole and sea bass, respectively) after a 2-month exposure to food contaminated with environmentally relevant concentrations were below the current maximum acceptable limit for seafood set by the European Union, which is 0.05 ppm ww (Official Journal of the European Union, 2014).

The MT concentrations found for both species were similar to those observed in wild fish, but lower than those found in cultured fish (Table 3). However, lower values were obtained by quantifying MT from the sea bass liver by spectrophotometry, as in our study, compared with liquid chromatography (Jebali et al., 2008) or polarography (Roméo et al., 1997). These results highlight that the observed variability in terms of the MT concentration between studies for a single species can be partly explained by the different analytical methods used.

Species	Location	Exposition (ppm dw)	Tissue	Cd (ppm dw)	MT	Reference
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Experimental	0.7 - 3.5 - 22.9	Liver Muscle Bile	0.5 - 2.8 - 14.9 0.002 - 0.008 - 0.09 0.007 - 0.02 - 0.12	142 - 343 - 326 (dw) / 526 - 822 - 619 (ww) / 8 - 24 - 11 (mg·g <sup>-1</sup> prot)	This study
	Experimental	5.4 - 38.5	Liver Muscle	15 - 20 1 - 4		Odzak and Zvonaric, 1995
	Southeastern Aegean Sea (Turkey)		Muscle	0.04		Dalman et al., 2006
	Eastern Mediterranean Sea (Turkey)		Liver Muscle	0.19 0.08		Dural et al., 2007
	Gironde estuary, France		Liver Muscle	0.58 0.02		Durrieu et al., 2007
	Seine estuary, France		Liver Muscle	0.07 0.02		Chiffolleau, 2001
	Charente river mouth, France		Muscle	0.04		Schnitzler et al., 2011
	Aegean Sea		Muscle	0.17		Alasalvar et al., 2002
	Eastern Mediterranean Sea (Turkey)		Liver Muscle	0.21 0.03		Türkmen et al., 2009
	Fish Farm, Portugal Arade estuary, Portugal		Liver Liver	1.18 0.22	15600 (ppm dw) 7000 (ppm dw)	Fernandes et al., 2007
	Aveiro estuary, Portugal		Liver		9 (mg·g <sup>-1</sup> prot)	Fonseca et al., 2011
<i>Solea senegalensis</i>	Experimental	0.7 - 3.5 - 22.9	Liver Muscle Bile	0.9 - 4.4 - 10.1 0.001 - 0.008 - 0.03 0.01 - 0.04 - 0.10	30 - 105 - 134 (dw) / 237 - 318 - 196 (ppm ww) / 11 - 6 - 4 (mg·g <sup>-1</sup> prot)	This study
	Experimental	0.16 (ppm ww)	Liver	0.15 (ppm ww)	1500 (ppm ww)	Siscar et al., 2014
	Huelva estuary, Spain		Liver Muscle	1.82 0.01		Vicente-Martorell et al., 2009
	Huelva estuary, Spain		Liver	6.6		Oliva et al., 2012a
	Huelva estuary, Spain		Muscle	0.015		Oliva et al., 2012b
	Coast of Senegal		Liver Muscle	1.57 0.03		Diop et al., 2016
	Bay of Cadiz, Spain		Liver Muscle	0.55 0.078		Galindo et al., 2012
	Aveiro estuary, Portugal		Liver		9 (mg·g <sup>-1</sup> prot)	Fonseca et al., 2011
<i>Hippoglossoides platessoides</i>	North Sea		Bile	5.1 ppb ww		Westerlund et al., 1998
<i>Mugil liza</i>	Guanabara Bay, Brazil		Bile	10 ppb ww		Hauser-Davis et al., 2012
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Experimental	300 (in sediments)	Bile	44.3 ppb ww		Andréasson and Dave, 1995

**Table 6 Review of Cd levels in the tissues of the sea bass *Dicentrarchus labrax* and the Senegalese sole *Solea senegalensis*. Concerning experimental studies, only those involving chronic dietary exposition were retained. Cd concentrations are expressed in ppm dry weight unless otherwise stated (ppm wet weight). As no previous study investigated Cd levels in bile of *D. labrax* and *S. senegalensis*, studies on other fish species are shown for comparison.**

## Metallothioneins induction

Binding sites are known to play a key role in the accumulation of metals in organisms which is the case for storage proteins, such as metallothioneins, for which gene transcription induction has been shown in marine fish after exposure to various metal ions, including Cd (Cheung et al., 2004; George et al., 1996). This induction results in an increase of the MT concentration in tissues depending on the time considered and exposure type. In the sea bass liver, MT induction has been shown 48 h after intraperitoneal injection (Jebali et al., 2008). In dietary studies involving exposure doses similar to those used in our study, induction also occurred in other marine species (Berntssen et al., 2001; Dang and Wang, 2009). Due to this metal induction, MT are commonly used as a biomarkers of environmental contamination in fish species (Hauser-Davis et al., 2012b).

In the present study, metal exposure only led to a slight increase of the MT levels in the sole liver during the depuration period (*i.e.*, T80 and T90) after feeding with the highest Cd concentration, which suggests that the basal hepatic pool of MT was high enough to sequester Cd ions, except for sole, in which *de novo* synthesis of MT was induced after the highest accumulated Cd level (*i.e.*, 70 days after the beginning of the exposition). This hypothesis was supported by Dallinger et al. in 1997, who concluded that for a slight Cd increase, sequestration was achieved by displacement of essential metals, such as zinc and copper, from MT binding sites. Additional MT synthesis was thought to occur only for higher Cd concentrations to bind excess metal.

No MT induction following Cd administration was generally observed in the liver of the two species for both of the exposure doses used in our study. Indeed, metal exposure is not always followed by induction of *de novo* MT synthesis. This was the case for Gilt-head seabream *Sparus aurata* sampled in different fish farming systems, which showed contrasting Cd concentrations in the liver, but similar MT levels (Creti et al., 2009). Induction seems to be species-dependent because 6 days after intraperitoneal injection, the MT levels increased three-fold over the basal values in the *S. aurata* liver, whereas they remained the same in *S. senegalensis* (Kalman et al., 2010). Conversely, MT synthesis can be influenced by environmental and endogenous factors related to season, gender and maturation (Hylland et al., 1998), as shown in *S. senegalensis*, for which the liver MT levels can vary with temperature (Siscar et al., 2014).

In our two experiments, the MT concentrations changed over time for both species, regardless of metal exposure or water parameters (*i.e.*, O<sub>2</sub>, pH, Temperature, Salinity; see Annex 1). Nevertheless, physical stresses, such as handling, are known to produce an elevation of physiological markers, such as the plasma cortisol and MT levels, in fish (Tort et al., 1996). In addition, cortisol has been identified as an endogenous inducer of MT synthesis (Fu et al., 1990; Hyllner et al., 1989). Outside sounds or cleaning of the tanks could thus have constituted stress sources, leading to the variability observed over time, inducing MT synthesis directly or indirectly via cortisol secretion in both exposed and control fish. Finally, the fact that the highest variability was observed for sea bass might be the result of its greater sensitivity due to its gregarious swimming behaviour and escape reactions in response to outside stimuli.

The fact that MT synthesis can be induced by various biotic and abiotic confounding factors implies that MT concentrations do not always reflect metal exposure and bioaccumulation in wild marine fish (Mieiro et al., 2011). The use of MT as a biomarker of contamination should thus be considered with caution in the natural environment as well as in experimental conditions, where external factors may induce MT synthesis.

### **Metallothioneins significance in the fate of Cadmium in fish tissues**

While there is no doubt about the possible influence of metal exposure on the MT concentration, very few studies have investigated the role of MT in metal accumulation kinetics in marine fish. Moreover, the net metal accumulation in an aquatic organism is the result of a balance among three mechanisms: the uptake rate ( $K_u$ ) from the diet, uptake rate of dissolved forms, and efflux rate. In marine fish, where metal influx from food has been shown to be dominant (Mathews and Fisher, 2009; Creighton and Twining, 2010), accumulation will be mainly dependent on the uptake rate from food and the elimination rate.

#### **Hepatic Cadmium uptake**

In fish, multiple routes for dietary Cd uptake along the gastrointestinal tract have been found. Among them, Cd ion passage through the intestinal wall is believed to occur via

essential metal transporters, such as calcium, copper, iron and zinc channels (McGeer et al., 2011). Moreover, amino acid and small peptide transporters may also participate in the uptake of Cd conjugated to cysteine or cysteine-containing oligopeptides. Once in the bloodstream, Cd is primarily transported by plasma transport proteins in which MT are found. The liver is the first organ that internalized metal will encounter, which gives it a primary role in Cd accumulation compared to other tissues, such as muscle, as observed in our species. The Cd concentrations in the liver of the two species were maximal 10 days after the end of the exposure period for the highest exposure dose. This offset might indicate a slight retention of Cd by the intestine before reaching the liver, as the intestine was shown to also accumulate Cd (Berntssen et al., 2001; Kim et al., 2006). Just as accumulation in the liver increased in a dose-dependent way, as shown in other fish species (Berntssen et al., 2001; Kim et al., 2006), the uptake rate ( $K_u$ ), calculated from the Cd concentrations in the liver increased with the exposure dose in the two species. The assimilation efficiency (AE), namely the portion of retained Cd following dietary ingestion, seems to be highly species-dependent since it can vary from 2 to 45% from one species to another (Mathews and Fisher, 2008; Zhang and Wang, 2007b). As a result, in experiment two,  $K_u$  in the sea bass liver was higher than in the sole liver, revealing faster accumulation in this species. This result might suggest that differences could exist in intestinal membrane metal transport between the two species, leading to greater AE in sea bass. This characteristic was confirmed by the significant accumulation compared to control fish that occurred after 10 days of exposure in sea bass and after 30 days in sole.

The hepatic MT levels were always higher in sea bass compared to sole regardless of the experiment, time or even conditions. In light of the above conclusions concerning MT induction, this greater MT pool would allow sea bass to support higher metal accumulation without triggering an induction of *de novo* MT synthesis. This interspecific difference in MT concentrations has been reported in the field without an obvious influence of the environment (Rosario Siscar et al., 2014). Furthermore, it seems that lower MT production can exist in flatfish compared to roundfish species for the same sampling area (Beg et al., 2015). Even if ecological features are involved, when overcoming environmental parameters, as in our study, different physiological responses can be related to metabolism and/or phylogenetic divergence. First, the higher metabolism in sea bass might imply higher requirements for essential metals, leading to the synthesis of more binding sites, including

those for MT. Second, MT the biochemical properties can display significant phylogenetic dependence (Scudiero et al., 2005), which might involve different responses to the same environmental conditions. Concerning the species used in the present study, the variation observed in the MT sequence for the same protein isoform may imply a slight difference in terms of function, resulting in different regulation patterns as well as different basal concentrations. This hypothesis can partially explain the species-specificity, which might have been driven by contrasting ecological niches (*i.e.*, demersal *versus* benthic). Finally, this species difference in MT levels could have been due to the life history of the fish, which did not come from the same origin and faced different farming conditions. Any previous influence of metal exposure on the starting MT levels can, however, be rejected, as sole showed the highest Cd concentration at T0, but the lowest MT basal pool.

In sum, the findings concerning the sea bass liver suggest an increase of the Cd uptake rate alongside the MT concentrations, as previously found in the whole body of other species (Long and Wang, 2005a, 2005b). These authors concluded that metal sequestration by MT may prevent the inhibition of membrane transporters caused by metal toxicity, notably by reducing the activity of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase in the gills. In our study, the high MT levels observed in the sea bass liver may have also been found in enterocytes. This characteristic might provide more efficient metal detoxification and thus reduce the inhibition of subsequent Cd assimilation. It implies that species with the highest MT levels would be subjected to increased metal accumulation, as observed in field studies (Fernandes et al., 2008) and by the very high correlation ( $r=0.991$ ) found between the Cd and MT concentrations in wild sea bass (Fernandes et al., 2007). In the natural environment it is however difficult to distinguish MT induction following metal exposure from a greater accumulation linked to high basal MT levels.

### **Cadmium efflux from the liver**

In fish, Cd depuration from the liver is the result of biliary excretion from the gallbladder to the intestine and is finally eliminated with faeces (McGeer et al., 2011). Biliary excretion was also dose-dependent and occurred after 30 days of exposure for both sea bass and sole for the highest exposure dose. Even if metal concentrations are known to be low in fish bile (Andréasson and Dave, 1995) and represent approximately only 1% of the Cd amount in the



liver, the fast bile turnover (*i.e.* renewal after each digestion) led to a significant decrease of the Cd hepatic concentrations, with a mean loss of near 40 and 60% for sole and sea bass respectively (Table 2). Biliary excretion was thus an efficient pathway for the Cd elimination in these two species. A similar trend was observed for the mullet *Mugil liza*, in which a weak negative correlation ( $r=-0.82$ ) was found between the Cd concentrations in the liver and those in bile, revealing that Cd is eliminated from the liver through biliary excretion (Hauser-Davis et al., 2012a). Despite the similarity between the biliary Cd concentrations found in the present study and those from other species (Table 3), 50 days were necessary to observe a significant decrease of the Cd concentration in the liver of our two species following dietary consumption of the highest dose. This time interval is higher than that observed for other species, in which the hepatic Cd amount can decrease after 10 days of depuration for similar exposures (Kim et al., 2004, 2006). This difference might be a side effect of the temperature decrease during our experiments, which may have inhibited Cd elimination by reducing the metabolism of the fish. Hepatic Cd decreases were not linear during the depuration period, which might reflect Cd release from other tissues (not analysed in this study) to the liver before final biliary excretion. Depuration in experiment one was only conducted for 30 days, so we cannot conclude if effective Cd elimination would occur in the liver at the lowest exposure dose after a longer depuration period. However, the exposure dose used in the second experiment (*i.e.*, 25 ppm dw) constituted the threshold from which effective Cd elimination occurred after 30 days in the liver of rockfish (Kim et al., 2006). Although the opposite was observed in the grunt *Terapon jarbua* (Long and Wang, 2005a), this result suggests that an increase of the dietary exposure dose will increase the efflux rate in the liver of these species.

To our knowledge, only one study has investigated the link between Cd elimination and MT levels in fish. Long and Wang in 2005a found a negative correlation between the MT concentrations and Cd efflux rate in the whole body of *T. jarbua*. However, individuals were pre-exposed to waterborne or dietary Ag and Cu for 1 week, making it difficult to compare their results with our study. MT seem to be involved in metal elimination in fish, as shown in the Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to copper, where an increase of the MT concentration in bile but not in the liver was observed (Hauser-Davis et al., 2014). The authors also found more MT-bound metal in the bile of exposed fish, confirming that MT constitute a vector for metal biliary excretion. This is in accordance with the higher biliary

excretion (*i.e.*, higher percentage of hepatic Cd in the sea bass bile; Fig. 4) and suggests that the greater basal MT pool in sea bass led to a higher amount of metal bound to MT, which enhanced Cd biliary excretion.

### **Cadmium relocation to muscle**

Cd elimination from the liver is also due to relocation to other tissues, such as muscle, through release into the general circulation. As in the liver, the Cd concentrations in muscle increased with exposure dose for both species in our study. Once relocated to muscle, Cd was globally not significantly eliminated from muscle during the depuration period and remained at the same level as at the end of the exposure period for both species. The same pattern has been observed in other fish species, for which Cd elimination has been shown to occur for all tissues investigated except the kidney and muscle (Kim et al., 2004, 2006). This observation of Cd retention in muscle leads to sanitary concerns since muscle represents the edible part of fish.

In sea bass, muscle accumulation occurred earlier and represented a higher proportion of hepatic Cd for both exposure doses (Fig. 1 and 4). This indicates that after digestion, Cd was transported from the liver to muscle more quickly and at larger proportions in sea bass. These observations may suggest a major transport of MT-bound Cd from hepatocytes to other tissues through blood as observed in mammals (Chan et al., 1993). However, Cd/MT complexes were retrieved in kidney which is a secretory organ, contrary to muscle which constitutes a long-time storage compartment. It is thus more likely to be the result of faster cellular turnover in the muscle of sea bass due to its swimming behaviour, implying a higher amino acid or protein requirement, to which Cd might be bound in the blood plasma. Mobility seems to constitute a trait that determines metal repartition, leading to higher muscular contamination in vagile species vs sedentary ones. Even if the Cd concentrations in sea bass muscle after a two-month exposure were below the current maximum acceptable limit for seafood set by the European Union, the present study noted some concerns about health safety regarding consumption of flesh from highly swimming species. This hypothesis could furthermore constitute a new key for comprehension of the high Cd amounts frequently observed in muscle of some pelagic predator fish, such as swordfish and tunas

(Araújo and Cedeño-Macias, 2016; Kojadinovic et al., 2007), despite the lack of Cd biomagnification along the trophic chain (Mathews et al., 2008; Mathews and Fisher, 2008).

## Conclusion

European sea bass *Dicentrarchus labrax* and Senegalese sole *Solea senegalensis* exposed for two months to two environmentally realistic dietary Cd doses presented different accumulation kinetics. The first exposure (3.5 ppm dw) resulted in significant accumulation in the muscle and liver of both species, but the Cd levels increased earlier in sea bass. Biliary excretion of metal only occurred for sea bass at the end of the one-month depuration period. With a higher exposure dose (22.9 ppm dw), significant accumulation also occurred in the liver as in the muscle of the two species. While the Cd amounts remained constant in muscle, the liver showed significant metal elimination after two months of depuration, coinciding with effective biliary excretion in the two fish. Meanwhile, sea bass presented a higher uptake rate at the highest exposure dose as well as higher biliary excretion in both experiments. Induction of MT synthesis varied over time, but was not triggered by metal exposure, calling into question the relevance MT for use as a biomarker of contamination. The basal MT pools were always greater in sea bass. This specific characteristic, coupled with or influencing accumulation kinetics, helps to explain the interspecific variability in terms of the metal concentrations observed in fish from marine environments, such as the Canary Current Large Marine Ecosystem.

# Chapitre 2

La répartition subcellulaire détermine la toxicité et les cinétiques d'accumulation du cadmium chez deux espèces de poissons marins

***Gaël Le Croizier, Camille Lacroix, Sébastien Artigaud, Stéphane Le Floch, Jean-Marie Munaron, Jean Raffray, Virginie Penicaud, Marie-Laure Rouget, Raymond Laë, Luis Tito De Morais.***

***Soumis à Environmental Science & Technology.***



## 1. RESUME

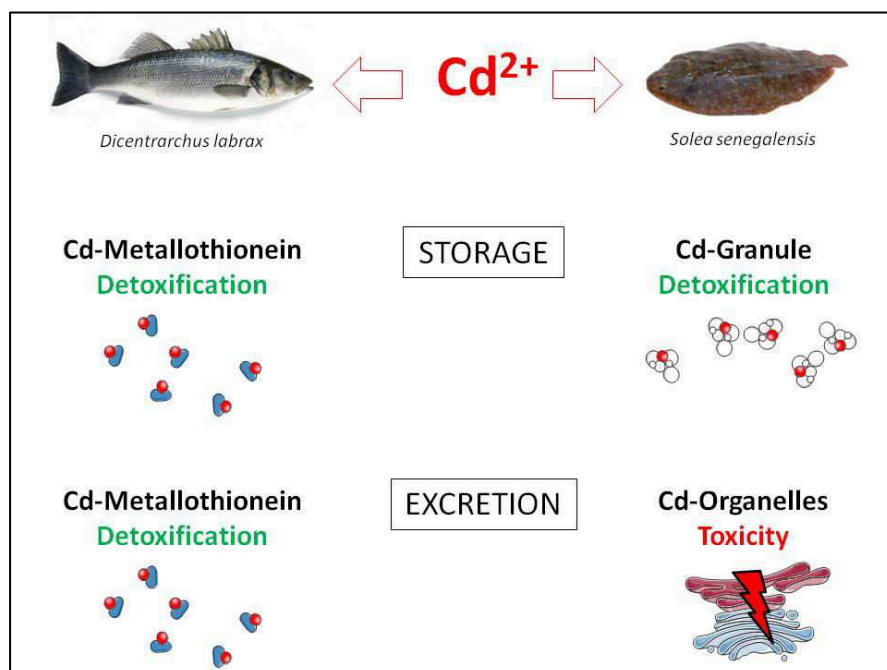
---

Les espèces présentent différentes stratégies de séquestration des métaux qui conditionnent la mise en place de mécanismes de détoxification et d'excrétion d'éléments toxiques comme le cadmium (Cd). La sensibilité au Cd n'est pas homogène dans toute la cellule, ainsi les organites du système endomembranaire (notamment le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi) ou les enzymes cytosoliques sont considérés comme hautement sensibles. En revanche, d'autres composés vont cependant participer à la formation de complexes organiques concourant à inhiber la toxicité des métaux non essentiels. Les métallothionéines (MT) appartiennent à cette catégorie, aux côtés de granules riches en métaux (MRG) ou de peptides tels que le glutathion réduit (GSH). L'hypothèse du « spillover » propose que le Cd ne soit uniquement retrouvé dans les fractions sensibles que lorsque les capacités de séquestration au sein des fractions détoxifiantes sont dépassées. Ce concept tend cependant à être revu suite à certaines études montrant la présence de métaux toxiques dans les fractions sensibles même à faible dose d'exposition (Campbell et al., 2008; Giguère et al., 2006). L'un des mécanismes par lesquels le Cd induit une toxicité est son interférence avec des éléments essentiels tels que le calcium ou le zinc (Martelli et al., 2006). D'autre part, certains de ces éléments confèrent un rôle de protection face aux métaux toxiques, notamment en favorisant les défenses antioxydantes (Martínez-Álvarez et al., 2005).

Cette étude a pour objet d'évaluer les modes de séquestration du cadmium, adoptés par deux espèces aux caractéristiques écologiques et physiologiques distinctes, le bar européen *Dicentrarchus labrax* et la sole sénégalaise *Solea senegalensis*, ainsi que l'implication de ces stratégies sur la toxicité et l'élimination du métal. La répartition du Cd et de métaux essentiels entre les fractions détoxifiantes et sensibles a été analysée dans le foie des deux espèces, après 2 mois d'exposition trophique à 22,9 ppm de Cd (poids sec) ainsi qu'après une période d'élimination de 2 mois supplémentaires. 6 fractions majeures ont été étudiées : les débris cellulaires, les granules (MRG), les mitochondries, les organites, les enzymes cytosoliques (HDP), les protéines et peptides cytosoliques (HSP) ainsi que dans les lipides de réserve lorsqu'ils étaient présents en quantité suffisante. Des mesures

biométriques ont été réalisées pour évaluer l'impact de la toxicité du Cd sur la croissance et le développement des organes.

Les résultats ont d'abord montré que l'exposition au Cd ne modifiait pas la répartition subcellulaire de cet élément pour une même espèce, participant à réfuter l'hypothèse du « spillover ». Les deux espèces montrent une séquestration préférentielle du Cd dans les fractions détoxifiantes tout en adoptant différentes stratégies. Ainsi, alors que la majorité du Cd est lié à la fraction incluant les MT dans le foie du bar, le métal est d'avantage piégé au sein de concrétions granulaires (MRG) chez la sole. La distribution des éléments essentiels a cependant été impactée par l'exposition au Cd, avec d'avantage de changements observés chez la sole, suggérant une plus forte sensibilité induite par altération de l'homéostasie des métaux essentiels chez cette espèce. L'exposition au Cd a de plus causé une diminution de la croissance pondérale chez la sole, probablement suite à la dégradation des lipides de réserve (Pierron et al., 2007). Alors que chez la sole, le Cd lié aux granules semble transiter par le système endomembranaire avant d'être excrété par des vésicules, les complexes Cd-MT chez le bar semblent être excrétés par la bile ou relargués dans la circulation sanguine après transport par des protéines transmembranaires. Ces deux méthodes de séquestration impliquent des voies d'excrétion contrastées, conduisant à des différences de sensibilité et d'efficacité d'élimination du Cd.



## 2. ARTICLE N° 2

---

# METAL SUBCELLULAR PARTITIONING DETERMINES SENSITIVITY TO CADMIUM TOXICITY AND ACCUMULATION KINETIC IN TWO MARINE FISH SPECIES

Gaël Le Croizier<sup>1</sup>, Camille Lacroix<sup>2</sup>, Sébastien Artigaud<sup>1</sup>, Stéphane Le Floch<sup>2</sup>, Jean-Marie Munaron<sup>1</sup>, Jean Raffray<sup>1</sup>, Virginie Penicaud<sup>1</sup>, Marie-Laure Rouget<sup>3</sup>, Raymond Laë<sup>1</sup>, Luis Tito De Morais<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/IFREMER, BP 70, 29280 Plouzané, France

<sup>2</sup>Centre of Documentation, Research and Experimentation on Accidental Water Pollution (CEDRE), 715 rue Alain Colas, CS 41836, Brest 29218-Cedex 2, France

<sup>3</sup>Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), Université de Bretagne Occidentale (UBO), CNRS UMS 3113, 29280 Plouzané, France



## Abstract

Cadmium (Cd) subcellular partitioning was investigated in the liver of two marine fish species, the European sea bass *Dicentrarchus labrax* and the Senegalese sole *Solea senegalensis*, dietary exposed for two months to an environmentally realistic Cd dose before a depuration period for further two months. Cd exposure did not modify Cd cellular repartition for either species, refuting the spillover hypothesis. Both species contained most part of Cd in detoxifying fraction (*i.e.* BIM: biologically inactive metal pool) but displayed different handling strategies. Cd was largely bound to heat stable proteins (HSP) including metallothioneins (MT) in sea bass while Cd was more linked to metal rich granules (MRG) in sole. Essential elements (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Se and Zn) whole liver concentrations and subcellular partitioning were also determined. Most impairment in essential metal homeostasis due to Cd exposure was found in sole. These elements followed Cd partitioning pattern, suggesting their involvement in antioxidant responses against Cd toxicity. Cd consumption decreased body weight growth in sole, probably due to impairment of lipid storage. During depuration period, the two species exhibited marked repartition patterns, implying different pathways for Cd elimination from liver. In sea bass, MT-bound Cd was thought to be excreted through bile or released in blood, crossing cell membrane via protein transporter. In sole, MRG-bound Cd was thought to be sequestered by organelles (*i.e.* endomembrane system) before to be also released in blood via vesicular exocytosis. These marked strategies in cellular Cd handling in liver might account for differential sensitivity to Cd toxicity as well as for differential Cd accumulation kinetics between the two marine fish species.

## Introduction

Aside from natural sources, marine ecosystems can be subjected to metal contamination due to urban effluents and industrial activities. Cadmium (Cd) is a common by-product of mining industry and can reach high levels in some regions (World Health Organization, 2010). Marine consumers like fish mainly accumulate metals through trophic pathway and display a wide range of Cd concentrations resulting from difference in foraging habitats and dietary habits (Goutte et al., 2015; Le Croizier et al., 2016a; Metian et al., 2013). In addition to ecological traits, the observed variability in terms of Cd bioaccumulation results from various physiological characteristics, among which the presence of metal binding proteins like metallothioneins (MT) (Hogstrand et al., 1991; Le Croizier, 2017). Cd is a toxic element responsible for numerous impairments in fish, like oxidative damage, disruption of essential metal homeostasis, endocrine and ionoregulation disruption, histopathology and depression of the immune system which can finally affect growth and survival (McGeer et al., 2011a).

Recently, attention has been focused on the fish species ability to cope with metal toxicity, depending on subcellular partitioning of the element (Eyckmans et al., 2012; Leonard et al., 2014). At the cellular level, Cd can take different chemical toxic forms including the following: free or complexed ion form (e.g.  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{CdCl}_2$ ); bound to enzymes (e.g. cytochromes); bound to organic acids (e.g. citrates); bound to cellular constituents causing damages (e.g. DNA) (Vijver et al., 2004). Nowadays, only few forms in Cd speciation are considered as detoxified: Cd complexed to peptides (e.g. glutathione) or functional, transport or sequestration proteins (e.g. metallothioneins); Cd trapped in vesicles of the lysosomal system or precipitated in mineral granules (Wang and Rainbow, 2006).

While one of the adverse effects of toxic metals is due to interference with essential elements (Martelli et al., 2006; Moulis, 2010), some of these latter confer protective role against metal toxicity, directly through formation of detoxifying complexes (Sasakura and T. Suzuki, 1998) or indirectly preventing for oxidative stress due to their association with antioxidant enzymes (Martínez-Álvarez et al., 2005; Talas et al., 2008). Despite evidence of the influence of cellular components like MT in metal accumulation kinetics in marine species (Wang and Rainbow, 2010), very few studies have investigated the link between metal subcellular partitioning and kinetic in fish (Glynn, 1991).

The present study aimed to investigate Cd intracellular distribution in the liver of two marine fish species, the European sea bass *Dicentrarchus labrax* and the Senegalese sole *Solea senegalensis*, exposed for two months to an environmentally realistic dietary cadmium (Cd) dose before a depuration period for further two months. Cd repartition was examined in six major subcellular fractions: cellular debris, metal-rich granules, mitochondria, organelles, cytosolic enzymes, cytosolic proteins and peptides as well as in storage lipids fraction when present. Sensitivity of the two species was assessed according to (1) Cd subcellular partitioning during accumulation and depuration periods, (2) impairments in essential metals subcellular distribution, (3) essential metal concentrations in the whole liver and their partitioning within hepatocytes, (4) growth and hepatosomatic index calculation. Finally, assumptions were made regarding the influence of Cd cellular speciation in the liver and Cd biliary excretion or transport to other tissues.

## **Materials and methods**

### **Fish and experimental procedures**

All details about animal procedures and experimental design can be found in Le Croizier et al., 2017. Briefly, immature sea bass *Dicentrarchus labrax* and immature Senegalese sole *Solea senegalensis* were reared in twelve tanks in the Cedre's (Centre of Documentation, Research and Experimentation on Accidental Water Pollution, Brest, France) marine animal facility. Fish were fed for two months with a Cd-spiked food Cd ( $22.9 \pm 0.3$  ppm dw) or with commercial pellet depending on their condition (*i.e.* Cd-exposed and control fish). For both species and condition, there were three replicates tanks. This exposition period was followed by a depuration where all fish were fed with commercial pellets. All animal procedures were in accordance with the French and EU guidelines for animal research (project approval number: 03266.03).

## **Biological sampling**

After the two month of Cd exposition, three fish per tank (nine for each condition) were anesthetized by bathing in a 0.05 mL/L solution of MS-222 before being euthanized by bathing in a 0.2 mL/L solution of MS-222. They were weighed, measured and dissected with ceramic tools to avoid metal contamination. The liver was collected, weighed and put in acid-washed (10 % HNO<sub>3</sub>) individual plastic microcentrifuge tubes, flash frozen in liquid nitrogen and store at -80 °C until further analysis. The same sampling was realised after two further months of depuration.

## **Subcellular partitioning procedure**

This procedure generally followed the protocol of Rosabal et al., 2015 (adapted from that of Wallace et al., 2003). Briefly, liver samples were fractionated into six operationally-defined subcellular fractions: cell membranes (cellular debris); metal-rich granules (MRG); mitochondria; nuclei + microsomes + lysosomes (organelles); heat-denatured proteins (HDP) including cytosolic enzymes; and heat-stable proteins and peptides (HSP) such as metallothionein (MT) and glutathione (GSH). Three liver samples of fish from the same tank were pooled to obtain approximately 200 mg of wet sample and homogenized in 1.5 mL of a solution containing Tris-HCl 20 mM pH 8.6, DTT (Dithiothréitol) 0.01 % as a reducing agent and 1 % of antiproteolytic agent (Protease Inhibitor Mix, GE Healthcare). A 100 µL aliquot was removed from the liver homogenate for determining total trace metal concentrations in the liver. The remainder of the liver homogenate was centrifuged at 1450 × g for 15 min at 4 °C. The supernatant (S1) was transferred to an acid-washed 1.5 mL polypropylene microcentrifuge tube for further separations. The pellet from this centrifugation was suspended in 0.5 mL of ultrapure water, heated at 100 °C for 2 min, digested with an additional 500 µL of 1 N NaOH at 65 °C for 60 min. Centrifugation at 10,000 × g for 10 min at ambient temperature (~20 °C) was performed to separate the NaOH-resistant fraction (referred as "MRG") from the cellular debris fraction that includes cell membranes, unbroken cells and nuclei. The S1 supernatant was centrifuged at 10,000 × g for 30 min at 4 °C to produce the mitochondrial fraction. The resulting supernatant was ultracentrifuged at 100,000 × g for 60 min at 10 °C, giving a pellet containing other organelles (microsomes and

lysosomes) and the cytosolic fraction in the supernatant. To separate the heat-stable peptides and proteins (HSP) from the heat-denatured proteins (HDP), the cytosolic fraction was held at 80 °C for 10 min, left on ice for 1 h and then centrifuged at 50,000 × g for 10 min at 10 °C. The HSP fraction, which includes MT was collected from the supernatant. Each fraction was finally kept at -20 °C until the metal analyses were performed.

### **Metal analyses**

Subcellular fractions were digested in a mixture of 2 ml of 70 % HNO<sub>3</sub> and 0.5 ml of 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (both of ultrapure quality) in Teflon vessels. Mineralization was performed on a hotplate during 4 h at 100 °C. A 100 µL aliquot was removed from the digestat and diluted to 15 ml with Milli-Q quality water (Merck Millipore). Cadmium and essential metals (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Se and Zn) were analysed using an ICP Q-MS (X Series 2, Thermo Scientific) at the Pôle de Spectrométrie Océan (PSO, Plouzané, France) with an internal standard solution of Rhodium. Reference materials (fish protein DORM-4 and lobster dogfish liver DOLT-5, NRCC) were treated and analysed in the same way as the samples. The results for reference materials displayed mean metal recoveries of 85 ± 6 % for DORM-4 and 91 ± 6 % for DOLT-5. Blanks were included in each analytical batch. The detection limits (ng·g<sup>-1</sup> dry wt) were 0.2 (Cd), 1.3 (Ca), 0.4 (Cu), 0.1 (Fe), 0.2 (Mg), 0.01 (Mn), 0.1 (Se) and 0.4 (Zn). Total metal concentrations in liver (ppm) are provided on a dry weight basis (µg·g<sup>-1</sup> dw). Proportion of metal in each fraction is expressed as a percentage of the sum of the concentrations of all fractions. As it was not present in all of the liver samples, the storage lipids fraction was not taken into account in the calculation of metal partitioning. Metal proportion in this fraction was express as a percentage of the total metal concentration in liver. The comparison between the sum of the metal concentrations measured in the all fractions including lipids and the total metal concentration in liver was 96 ± 8 %.

### **Data analysis**

All of the data submitted to the statistical tests were first checked for normality (Shapiro-Wilks test) and homogeneity of variances (Bartlett test). When these conditions were verified raw data were used, otherwise non-parametric analogues were used. One-way

ANOVAs followed by Tukey's HSD tests, and Kruskal-Wallis tests followed by Conover-Iman multiple comparison tests with Bonferroni's adjustment method were performed to test differences between conditions and species. All of the statistical analyses were performed using the free software R (R Core Team, 2016).

## **Results and Discussion**

### **Impact of Cadmium exposure on Cadmium and essential metals partitioning**

#### **Cadmium Exposition**

In the present study, while hepatic Cd concentration increased in both species following dietary Cd exposition (see Supporting Information), no modification was observed in Cd subcellular partitioning in the liver of both species, as revealed by the similar Cd proportion held by each fraction between control and exposed fish within a same species (Table 1). These results go against the spillover hypothesis which postulates that toxic metals would be sequestered in sensitive fractions only when binding capacities of detoxified fractions are exceeded (McGeer et al., 2011a). Accordingly, many studies showed that there is no threshold exposure concentration below which Cd bound to sensitive fractions was not observed in wild fish (Campbell et al., 2008; Fan et al., 2015; Giguère et al., 2006).

Because Cd presents similar chemical properties with other divalent cations like Ca, Cu, Fe and Zn, it can disturb essential metals homeostasis, mainly by competing for metal channels or transporters and intracellular binding sites (Martelli et al., 2006; McGeer et al., 2011a; Moulis, 2010). Cd exposure was thus shown to interact with transport and storage of various metals in fish (Baldisserotto et al., 2005; Kwong et al., 2010), leading to modifications of essential element levels in the whole tissues as well as in subcellular fractions (Kamunde and MacPhail, 2011a, 2011b). Here, no modification due to Cd accumulation was either found in essential element concentrations in the liver of the two species (see Supporting Information). It suggests that for this environmentally realistic exposure condition, Cd concentration was not high enough to inhibit uptake and accumulation of other metals considering the whole organ.

At the cellular level, some modifications were meanwhile observed regarding elemental partitioning due to Cd exposition. Various biomolecules specialized in handling of essential metals can represent ligands for this toxic element. Among them, organelles constitute important sites for sequestration and transport of Zn (Maret, 2011). Consequently, the decrease of Zn proportion (from  $18 \pm 3.9 \%$  to  $6.7 \pm 5.2 \%$ ) observed in the organelles fraction after Cd exposure in the hepatic cells of the sole might be due to Zn replacement by Cd ions as already observed in experimental (Kamunde and MacPhail, 2011a) and field studies (Dallinger et al., 1997). The Se proportion also decreased (from  $19.4 \pm 6.9 \%$  to  $6.7 \pm 3.2 \%$ ) in the sole organelles fraction after Cd exposure. It has been demonstrated that Endoplasmic reticulum (ER), which is part of the organelles fraction, can be subjected to Cd toxicity through inhibition of ER-resident selenoproteins expression (Zhao et al., 2014). The decreasing Se proportion in the organelles fraction may thus reflect a reduction in the ER selenoprotein concentration due to Cd toxicity.

Species	Time	Element	Subcellular partitioning (%)							
			Total metal (ppm)		Organelles		MRG		MTLP	
			Control	Exposed	Control	Exposed	Control	Exposed	Control	Exposed
<i>D. labrax</i>	Cd Exposition	Cd	<b>0.5 ± 0.2</b>	<b>14.9 ± 3.0</b>	6.2 ± 5.3	2.7 ± 2.8	2.6 ± 0.7	4.5 ± 2.6	64 ± 3.8	58.5 ± 9.5
		Ca	48.1 ± 39.5	68.4 ± 19.3	11.2 ± 9.2	9.1 ± 9.3	52.5 ± 17.0	40.0 ± 34.5	15 ± 7.8	16.2 ± 7.8
		Cu	10.7 ± 6.8	9.9 ± 2.0	7.0 ± 6.0	3.4 ± 3.6	6.3 ± 2.2	8.6 ± 5.3	61 ± 3.2	52.6 ± 9.8
		Fe	50.0 ± 32.3	27.8 ± 6.6	41.7 ± 26.0	34.7 ± 23.3	8.8 ± 3.9	17.6 ± 12.3	5.6 ± 3.1	4.1 ± 0.3
		Mg	109.0 ± 54.6	88.8 ± 19.0	21.3 ± 20.5	10.4 ± 14.8	10.0 ± 4.2	20.2 ± 14.6	47.1 ± 11.8	41.2 ± 4.2
		Mn	0.6 ± 0.3	0.4 ± 0.1	23.2 ± 18.2	14.7 ± 20.7	10.0 ± 2.0	20.9 ± 15.4	40.7 ± 8.1	31.1 ± 5.8
		Se	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.3	21.7 ± 15.1	13.6 ± 14.8	4.0 ± 0.6	9.8 ± 6.2	20.6 ± 3.1	16.1 ± 2.6
	Zn	16.0 ± 1.7	22.3 ± 12.9	19.9 ± 17.0	13.5 ± 16.6	2.6 ± 0.4	10.7 ± 6.9	28.8 ± 5.4	25.9 ± 6.5	
	Depuration	Cd	<b>0.3 ± 0.0</b>	<b>7.2 ± 0.7</b>	20.1 ± 0.9	15.4 ± 4.7	1.3 ± 0.3	1.6 ± 0.7	53.7 ± 1.4	61.8 ± 5.6
		Ca	9 ± 2.4	25.8 ± 29.0	18.4 ± 16.3	12.9 ± 3.1	53.8 ± 42.8	69.3 ± 4.1	13.2 ± 12.6	9.6 ± 3.7
		Cu	8 ± 1.2	10.1 ± 1.8	20.2 ± 1.2	16.5 ± 4.8	2.4 ± 0.7	2.5 ± 1.3	53.2 ± 1.2	59.8 ± 5.9
		Fe	18.6 ± 2.9	20.7 ± 3.4	56.6 ± 1.2	60.6 ± 12.8	2.7 ± 0.5	3.1 ± 1.5	6.7 ± 2.0	8.3 ± 8.3
		Mg	57.5 ± 3.4	62.5 ± 0.7	42.1 ± 1.0	40.3 ± 5.4	3.8 ± 1.3	4.2 ± 1.1	33.7 ± 1.8	38.8 ± 5.7
		Mn	0.3 ± 0	0.3 ± 0.0	38.2 ± 2.3	37.7 ± 4.2	5.8 ± 2.6	6.1 ± 0.7	29.3 ± 1.9	33 ± 4.5
Se		0.2 ± 0	0.3 ± 0.0	31.7 ± 1.2	28.4 ± 5.5	3.1 ± 0.3	3.9 ± 1.0	16.6 ± 0.1	18.6 ± 3.1	
Zn	12.3 ± 1.3	13.0 ± 2.0	28.1 ± 0.8	23.5 ± 5.0	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.2	<b>21.1 ± 1.9</b>	<b>27.7 ± 2.1</b>		
<i>S. senegalensis</i>	Cd Exposition	Cd	<b>0.8 ± 0.2</b>	<b>10.1 ± 1.9</b>	15.3 ± 3.3	5.4 ± 5.6	10.4 ± 3.7	25.9 ± 11.6	9.6 ± 1.2	9.2 ± 0.1
		Ca	69.2 ± 49.1	42.5 ± 39.7	6.7 ± 1.8	8.3 ± 11	36.2 ± 10.5	41.3 ± 27.9	23.2 ± 6.9	18.6 ± 5.0
		Cu	75.7 ± 32.1	66.0 ± 35.6	14.4 ± 1.5	8.2 ± 4.4	11.8 ± 2.4	28.4 ± 14.3	1.6 ± 1.3	2.2 ± 1.9
		Fe	10.7 ± 4.7	8.3 ± 2.5	13.8 ± 2.9	12.1 ± 3.7	14.8 ± 2.6	26.7 ± 14.0	4.9 ± 0.5	7.9 ± 5.4
		Mg	121.0 ± 20.7	86.5 ± 11.9	6.2 ± 2.3	3.2 ± 2.3	16.8 ± 4.5	30.2 ± 14.2	39.4 ± 3.5	40 ± 5.5
		Mn	1.0 ± 0.0	1.2 ± 0.1	8.2 ± 1.9	3.8 ± 3.7	19.0 ± 2.6	37.5 ± 18.2	26.6 ± 3.2	26.8 ± 1.2
		Se	1.4 ± 0.5	1.6 ± 0.5	<b>19.4 ± 6.9</b>	<b>6.7 ± 3.2</b>	5.4 ± 1.9	13.4 ± 8.0	7.5 ± 4.0	7.6 ± 3.1
	Zn	11.5 ± 1.8	14.3 ± 1.7	<b>18 ± 3.9</b>	<b>6.7 ± 5.2</b>	6.7 ± 3.0	15.4 ± 5.6	18.9 ± 1.8	21 ± 0.7	
	Depuration	Cd	<b>1.0 ± 0.4</b>	<b>10.0 ± 2.8</b>	<b>37.3 ± 5.9</b>	<b>51.5 ± 4.8</b>	16.4 ± 9.0	9.2 ± 5.1	3.9 ± 2.4	4.1 ± 2.2
		Ca	81.1 ± 57.6	16.5 ± 3.6	28.3 ± 10.2	39.5 ± 14.7	37.7 ± 16.9	32.6 ± 13.7	17.5 ± 2.0	13.5 ± 2.3
		Cu	52.9 ± 2.8	47.4 ± 2.1	36.6 ± 6.3	49.3 ± 7.6	16.9 ± 9.6	8.1 ± 2.8	3.9 ± 3.3	6.8 ± 3.4
		Fe	4.8 ± 0.4	6.1 ± 2.0	<b>30.1 ± 2.4</b>	<b>41.2 ± 1.4</b>	<b>16.9 ± 3.2</b>	<b>9.2 ± 2.6</b>	8.9 ± 1.3	6.8 ± 1.3
		Mg	91.1 ± 20.7	82 ± 6.9	<b>36.5 ± 6.4</b>	<b>52.1 ± 3.4</b>	<b>13.6 ± 2.7</b>	<b>7.7 ± 1.3</b>	28.6 ± 2.9	23 ± 4.3
		Mn	1.2 ± 0.2	1.2 ± 0.1	<b>36.8 ± 3.7</b>	<b>49.4 ± 1.8</b>	<b>16.8 ± 3.0</b>	<b>10.3 ± 1.5</b>	23 ± 4.2	20.1 ± 2.8
Se		1.0 ± 0.0	0.9 ± 0.1	32.8 ± 3.9	43.6 ± 6.8	10.6 ± 6.8	5.8 ± 1.4	11.6 ± 2.9	12.3 ± 1.5	
Zn	9.7 ± 1.7	11.7 ± 2.4	<b>31.4 ± 3.2</b>	<b>43.3 ± 4.1</b>	10.6 ± 7.0	7.4 ± 2.2	5.8 ± 0.5	4.6 ± 0.9		

**Table 7 Total metal concentration (ppm dry weight, mean ± sd) and subcellular partitioning (% of the total metal contained in each fraction, mean ± sd) of metal elements after 60 days of Cd dietary exposition and after 60 days of depuration in the liver of the sea bass *Dicentrarchus labrax* and the senegalese sole *Solea senegalensis* for both conditions (exposed and control fish). Values are shown only for organelles, metal rich granules (MRG) and metallothionein like proteins (MTLP) fractions where metal repartition significantly differed between control and exposed fish (values in bold; ANOVA,  $p < 0.05$ ). No difference between control and exposed fish was found in total metal concentration in the liver of both species, neither in metal repartition in cellular debris, mitochondria and heat denaturable proteins (HDP) fractions (see Supporting Information).**



## Depuration

While very few changes in metal partitioning were found during Cd accumulation, Cd elimination from liver led to more disturbances (Table 1).

First, Cd proportion increased in the organelles fraction (from  $37.3 \pm 5.9$  % to  $51.5 \pm 4.8$  %) in the liver of the sole at the end of the depuration period. Organelles fraction gathers cellular components involved in the vesicular transport which is a major pathway for extracellular excretion: Golgi apparatus (GA), endoplasmic reticulum (ER) and lysosomes. ER manages the sequestration of molecules and their binding to excretory proteins which are transported through GA and cytosol by vesicles (among which lysosomes) and finally excreted across the plasma membrane. Increasing Cd occurring in the organelles fraction during depuration period might be the reflect of Cd exocytosis via vesicles, which lead to total Cd elimination from the liver tissue as described in sole in a previous study (Le Croizier, 2017).

Second, Cd exposure followed by depuration period also led to a displacement of essential elements (*i.e.* Fe, Mg, Mn and Zn) from metal rich granules (MRG) to organelles in the sole liver (e.g. Fe proportion increased from  $30.1 \pm 2.4$  to  $41.2 \pm 1.4$  % in organelles while decreased from  $16.9 \pm 3.2$  % to  $9.2 \pm 2.6$  % in MRG). MRG are inorganic insoluble concretions containing mainly Ca phosphate in marine organisms (George et al., 1980), as highlighted by the high proportion of Ca in the MRG fraction in both species ( $69.3 \pm 4.1$  % and  $32.6 \pm 13.7$  % for sea bass and sole respectively, during depuration period). These structures can play an important role in accumulation and detoxifying of metals in fish (Lapointe et al., 2009b; Leonard et al., 2014).

The increasing proportion of Cd and essential metals in organelles coinciding with a decrease of essential metals in MRG may be caused by sequestration of MRG by ER, which is part of the organelles fraction. This hypothesis seems reasonable since MRG in our species contained the highest proportion of Ca and ER is highly involved in Ca storage (Görlach et al., 2006). Ca supplementation in fish diet has furthermore been shown to increase Cd in MRG while decrease in organelles (Ng et al., 2009). Although the authors did not conclude that way, our assumption is that increasing cellular Ca concentration will reduce the probability for Cd bound to calcium granules to be sequestered by ER during Ca uptake. The changes in

essential metal cellular repartition would thus be a side effect of Cd transport from MRG to organelles (*i.e.* ER, GA and vesicles in this order) before final exocytosis.

Conversely, no change in Cd partitioning was observed in the sea bass liver despite effective Cd elimination and biliary excretion also occurred in this species during depuration period (Le Croizier, 2017). In mammals, Cd bound to glutathione (GSH) was shown to be excreted from hepatocytes to bile while Cd bound to metallothionein (MT) would be released into blood before to reach other organs like kidney (Ballatori, 1991; Chan et al., 1993; Klaassen, 1978; Nordberg, 1978). In fish, MT were reported in bile (Hauser-Davis et al., 2012c) and were shown to transport metal during biliary excretion in Cu and Se-exposed fish (Hauser-Davis et al., 2016, 2014b). As more than half of the Cd (e.g.  $58.5 \pm 9.5$  % during exposition period) was bound to HSP regardless of time and condition in the sea bass (Table 1), it might suggest that Cd complexed to components of the HSP fraction (*i.e.* MTLP or GSH) was excreted directly from cytoplasm to bile or blood without passing through another cellular compound.

This elimination of Cd-saturated MT may lead to a new pool of free MT which would be available for binding other metals. In accordance with the well identified large Zn-binding capacities of MT and the competition between Cd and Zn (Maret, 2011; Moulis, 2010), MT turnover during exocytosis of Cd-MT complexes may have enhanced Zn binding to newly-synthesized MT, as suggested by increasing proportion of Zn (from  $21.1 \pm 1.9$  % to  $27.7 \pm 2.1$  %) in HSP fraction after depuration period (Table 1).

Finally, it should be noticed that more disturbances in metal homeostasis were observed following Cd exposition in the sole liver, indicating a greater sensitivity to Cd toxicity by interference with essential elements in this species than in the sea bass.

### **Link between subcellular Cadmium handling and Cadmium toxicity in both species**

In the two fish species, the most part of Cd was found in a detoxifying fraction (MRG or HSP) but followed two different patterns. Sea bass presented more Cd bound to HSP ( $58.5 \pm 9.5$  % in sea bass *versus*  $9.2 \pm 0.1$  % in sole) whereas Cd was more linked to MRG in sole ( $25.9 \pm 11.6$  % *versus*  $4.5 \pm 2.6$  % in sea bass) (Table 8 and Figure 19).



Figure 19 Cadmium (Cd) and essential metals subcellular partitioning (% of the total metal contained in each fraction) in the liver of the sea bass *Dicentrarchus labrax* and the Senegalese sole *Solea senegalensis* after 60 days of dietary Cd exposition (left panels) and after 60 days of depuration (right panels). BAM: biologically active metal pool. BIM: biologically inactive metal pool. Cellular debris fraction is not shown as it does not belong to BAM nor BIM, but was taken into account in the calculation of the partitioning (for Cd proportions in Cellular debris, see Supporting Information). “\*” indicates significant difference between species (ANOVA; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

Despite these different storage strategies, the biologically inactive metal (BIM) pool was similar between species ( $31.5 \pm 30.2$  % and  $17.6 \pm 11.7$  % for sea bass and sole respectively) implying the same resistance to Cd toxicity (Table 2). On the other hand, while more than half of the Cd ( $61.8 \pm 5.6$  %) was still bound to HSP in the sea bass after depuration period, Cd partitioning in the sole evolved compared to exposition period, leading to greater biologically active metal (BAM:  $24.8 \pm 21.2$  %) pool compared to BIM ( $6.7 \pm 4.5$  %) in this species. The different storage strategies implying the different supposed ways for Cd exocytosis discussed above (*i.e.* direct transport of MT-bound Cd to the membrane in sea bass *versus* passing of MRG-bound Cd through RE and GA before excretion by vesicle in sole), may thus be responsible for a greater sensibility of sole to Cd toxicity (Figure 20).

When present, storage lipids fraction accounted for a non negligible part of the internalized Cd in liver ( $29.3 \pm 9.8$  % in control sole and  $26.7 \pm 10.8$  % in control sea bass after exposition period) (see Supporting Information). Cd is known to stimulate lipid peroxidation process, defined as oxidative deterioration of polyunsaturated fatty acids and resulting in alteration of cell membranes (Roméo et al., 2000; Viarengo et al., 1989). Cd binding to this fraction may thus cause oxidation of neutral lipids, preventing their use in membrane structure. Cd was also shown to reduce efficiency of lipid storage increasing utilisation of triglycerides, finally leading to a lower body weight growth in exposed fish (Pierron et al., 2007). Although no growth impairment was observed according to length measurement and HSI calculation, a significant weight decrease was found in Cd-exposed soles compared to controls ( $38.8 \pm 5.6$  g vs  $46.0 \pm 7.2$  g respectively) (Table 3). Moreover, storage lipids fraction was never found in the liver of Cd exposed soles in both sampling times (see Supporting Information). In addition to the disturbances in essential metal homeostasis, the greater sensitivity of the sole to Cd toxicity was thus revealed by an alteration of the whole-body condition due to fat consumption.

	Cd Exposition		Depuration	
	BAM	BIM	BAM	BIM
<i>D. labrax</i>	7 ± 4.9	31.5 ± 30.2	10.8 ± 4.3	31.7 ± 33.2
<i>S. senegalensis</i>	3.2 ± 3.6	17.6 ± 11.7	<b>24.8 ± 21.2</b>	<b>6.7 ± 4.5</b>

Table 8 Subcellular partitioning (% of the total metal contained in each metal pool, mean ± sd) of metal elements after 60 days of Cd dietary exposition and after 60 days of depuration in the liver of the sea bass *Dicentrarchus labrax* and the senegalese sole *Solea senegalensis*. BAM: biologically active metal pool (i.e. sensitive fractions); BIM: biologically inactive metal pool (i.e. detoxifying fractions). Values in bold indicate significant difference between BAM and BIM (ANOVA,  $p < 0.001$ ). No difference between species was found for a same metal pool (BAM or BIM) and condition (Cd Exposition or Depuration).

Species	Condition	Length (mm)	Weight (g)	HSI
<i>D. labrax</i>	Control	169.7 ± 12.6	50.1 ± 11.0	1.7 ± 0.3
	Exposed	165.3 ± 9.3	42.2 ± 8.0	1.6 ± 0.4
<i>S. senegalensis</i>	Control	163.2 ± 8.4	<b>46.0 ± 7.2</b>	1.3 ± 0.4
	Exposed	158.4 ± 6.0	<b>38.8 ± 5.6</b>	1.2 ± 0.3

Table 9 Length (mm), weight (g) and hepatosomatic index (HSI) (mean ± sd) of the sea bass *Dicentrarchus labrax* and the senegalese sole *Solea senegalensis* after 60 days of Cd dietary exposition for both conditions (exposed and control fish). Values in bold indicate significant difference between control and exposed sole (ANOVA,  $p < 0.05$ ). No difference between conditions was found for length and HSI for a same species.

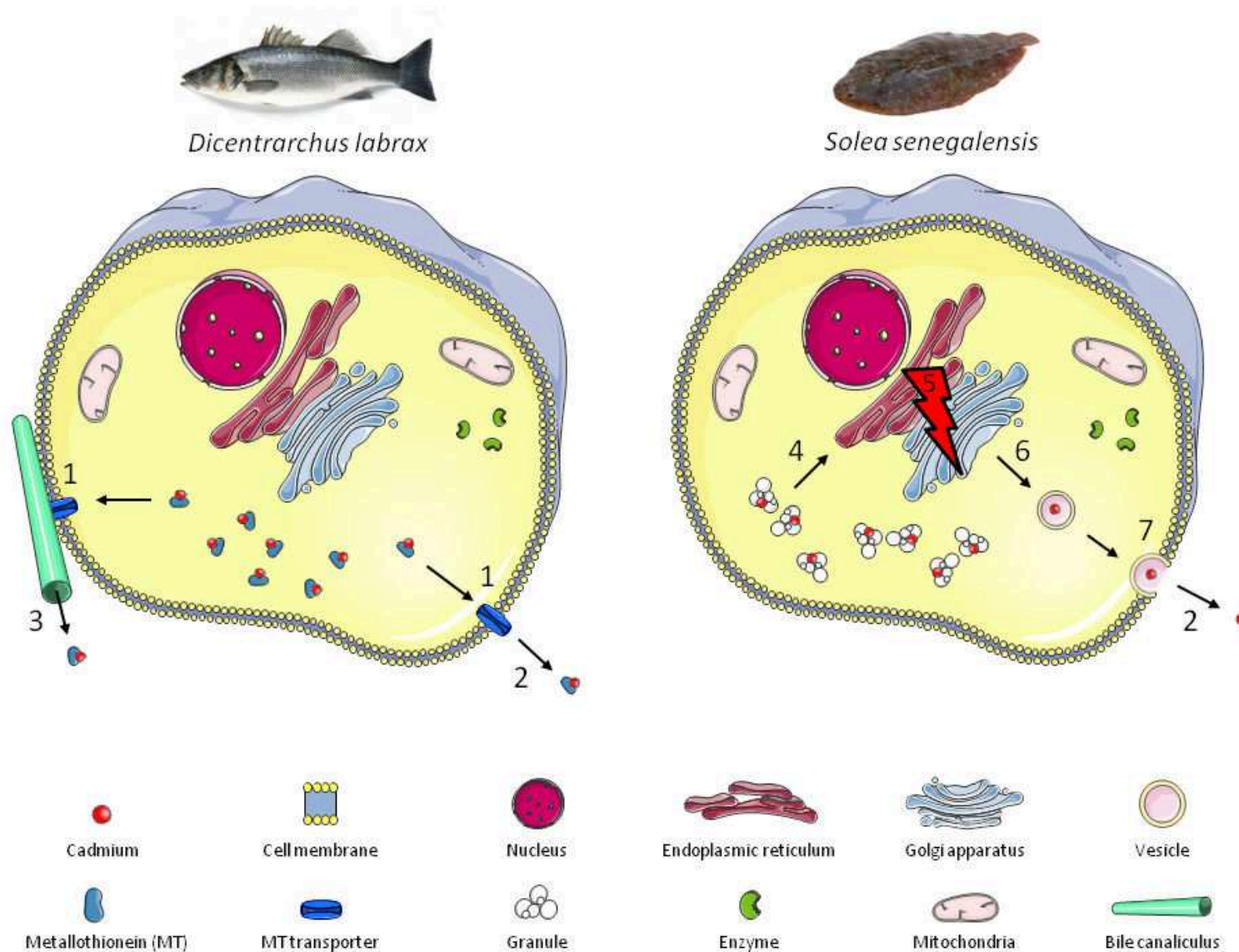


Figure 20 Subcellular Cd dynamics in hepatocytes of the sea bass *Dicentrarchus labrax* and the Senegalese sole *Solea senegalensis*. Only the two main mechanisms of Cd handling are represented: binding to metallothionein in sea bass and binding to granules in sole. 1: Excretion of Cd/MT complexes trough MT transporters; 2: Release in blood; 3: Release in bile; 4: sequestration of metal rich granules by endoplasmic reticulum; 5: damages due to Cd toxicity; 6: vesicular transport; 7: vesicular exocytosis.

## Essential metals protection against Cadmium toxicity in both species

One of the main mechanisms for Cd cellular toxicity is the induction of oxidative stress by production of oxygen free radicals (Almeida et al., 2002; Roméo et al., 2000). On the other hand, some elements are essential for activity of antioxidant enzymes like glutathione peroxidases (GPx), catalases (CAT) and superoxide dismutases (SOD), which respectively contain Se, Fe and Mn-Cu-Zn as cofactor (Vural et al., 2010). These enzymes are highly involved in preventing oxidative stress in fish (Basha and Rani, 2003; Janz, 2011; Martínez-Álvarez et al., 2005). For instance, oxidative stress caused by Cd was reduced by Se treatment in the liver of the rainbow trout (Talas et al., 2008). Beside from the well documented role of Se in the detoxification of mercury (Hg) through formation of Hg-Se complexes (Khan and Wang, 2009; Pelletier, 1986), it has been suggested that Se could also complex to Cd and subsequently bind to a selenoprotein P, thus reducing Cd availability and toxicity (Sasakura and T. Suzuki, 1998; Rosario Siscar et al., 2014). The resistance of a species regarding Cd toxicity might thus depend for part on the level of elements enhancing antioxidant response or able to complex Cd. The two fish species investigated in our study presented some differences in hepatic concentrations of such elements (Figure 21). While the sea bass liver contained more Fe ( $27.8 \pm 6.6$  ppm in sea bass vs  $8.3 \pm 2.5$  ppm in sole), sole showed higher amounts of Cu, Mn and Se (e.g.  $66 \pm 35.6$  ppm of Cu in sole vs  $9.9 \pm 2.0$  ppm of Cu in sea bass) (see Supporting Information and Figure 21). Regarding essential metal concentrations, the two species seems thus to possess contrasting defense capabilities, involving different antioxidant enzymes.

Despite higher levels of Cd in two sensitive fractions in sea bass (*i.e.*  $12 \pm 4.2$  % in mitochondria and  $6.3 \pm 1.8$  % in cytosolic HDP) compared to sole ( $3.8 \pm 1.2$  % in mitochondria and  $0.5 \pm 0.0$  % in HDP) after Cd exposition, the former also contained more antioxidant metals (Cu, Se and Zn) in these fractions (e.g.  $12.3 \pm 3.7$  % vs  $3.2 \pm 0.2$  % of Cu in mitochondria for sea bass and sole respectively) (Figure 19, left panels). Similarly, large proportions of Cu, Mg, Mn, Se and Zn were observed alongside the higher Cd proportions in two sensitive fractions (*i.e.*  $51.5 \pm 4.8$  % in organelles and  $18.8 \pm 1.1$  % cytosolic HDP) found after depuration in sole compared to sea bass ( $15.4 \pm 4.7$  % in organelles and  $9.0 \pm 1.4$  % in HDP). As the three types of antioxidant enzymes (GPx, CAT, SOD) are all found in cytosol, mitochondria and organelles (Bai et al., 1999; Martínez-Álvarez et al., 2005; Orbea et al.,

2000), the fact that essential metals followed Cd distribution in sensitive fractions might reflect their mobilization to activate antioxidant defenses and concur to prevent Cd damages upon cellular components.

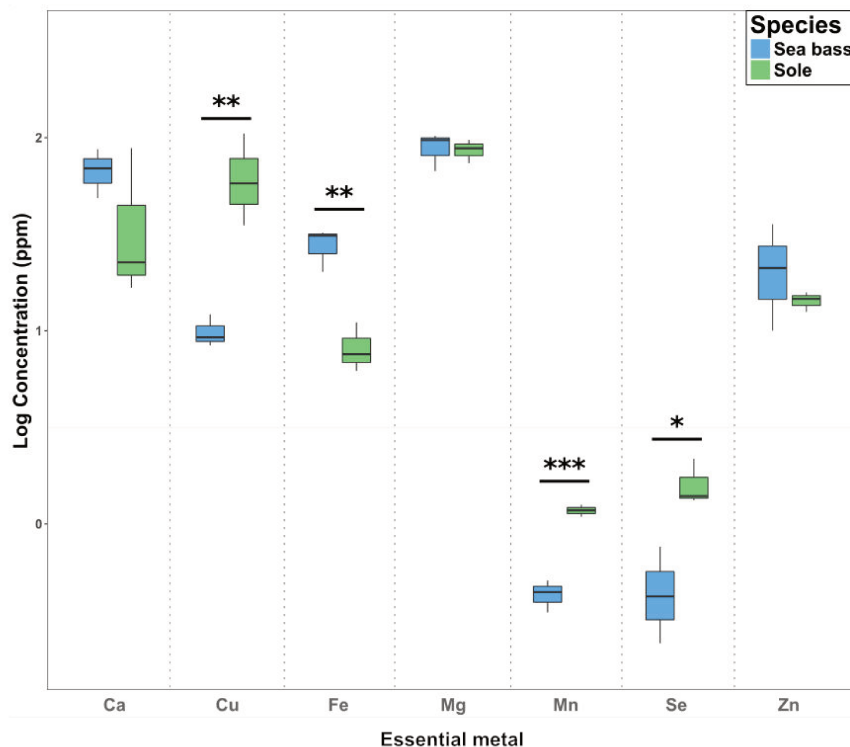


Figure 21 Total essential metal concentrations (log transformed values, ppm dw) in the liver of the sea bass *Dicentrarchus labrax* and the Senegalese sole *Solea senegalensis* after 60 days of dietary Cd exposition. “\*” indicates significant difference between species (ANOVA; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ). No difference was found in total essential metal concentrations between control and exposed fish of a same species (see Supporting Information).

### Link between Cadmium partitioning and hepatic excretion

In a previous study, higher MT concentration alongside higher Cd biliary excretion and relocation to muscle were found in sea bass, suggesting that MT level would enhance Cd excretion from the liver (Le Croizier, 2017). Even if Cd was also excreted from sole hepatocytes, Cd elimination seemed higher in the sea bass (not significant) since 60 % of the Cd in liver was eliminated in this species after two months of depuration *versus* 40 % in the sole. Regarding subcellular partitioning, two main mechanisms were likely to give the sea bass a greater Cd elimination from hepatocytes.



First, the large proportion of Cd bound to HSP might facilitate biliary excretion via transport of Cd/GSH complexes through a specific transporter of GSH present in the canalicular membrane (Zalups and Ahmad, 2003), or via transport of Cd/MT complexes as suggested by recent observations of MT in bile of metal-exposed fish (Hauser-Davis et al., 2016, 2014b, 2012c) (Figure 20).

Second, transport of Cd/MT through plasma membrane in the sea bass might be faster than vesicular exocytosis occurring in sole. Even if MT release from various organs to blood has been proved, the mechanism for epithelial transport of MT is not known (Chan et al., 1993; Moltedo et al., 2000), as well as that for Cd/MT complexes transport (Moulis et al., 2014; Sabolić et al., 2010; Zalups and Ahmad, 2003). MT seem however not to be released by the classical vesicular secretory pathway while transport across membrane must occur directly from the cytoplasm to the exterior of the cell through ATP-binding cassette transporters (ABC transporters) (De Lisle et al., 1996) (Figure 20). Conversely, vesicular exocytosis of MRG-derived Cd in sole must imply successive steps including fusion of vesicle and plasma membranes. During this process, Cd might be retained for some time into plasma membrane, as suggested by higher Cd proportion in the cellular debris fraction observed in sole compared to sea bass ( $55.2 \pm 5.3$  % in sole vs  $16 \pm 10.6$  % in sea bass after Cd exposition) (see Supporting Material).

# Partie 2

Les déterminants  
écologiques de  
l'accumulation des métaux  
par les poissons marins



# Chapitre 3

Influence de l'écologie trophique sur la bioaccumulation des métaux chez les poissons marins, déduite de l'analyse des isotopes stables et des acides gras

***Gaël Le Croizier, Gauthier Schaal, Régis Gallon, Massal Fall, Fabienne Le Grand, Jean-Marie Munaron, Marie-Laure Rouget, Eric Machu, François Le Loc'h, Raymond Laë, Luis Tito De Morais. (2016). Trophic ecology influence on metal bioaccumulation in marine fish: Inference from stable isotope and fatty acid analyses. Science of The Total Environment, 573, 83-95.***

## 1. RESUME

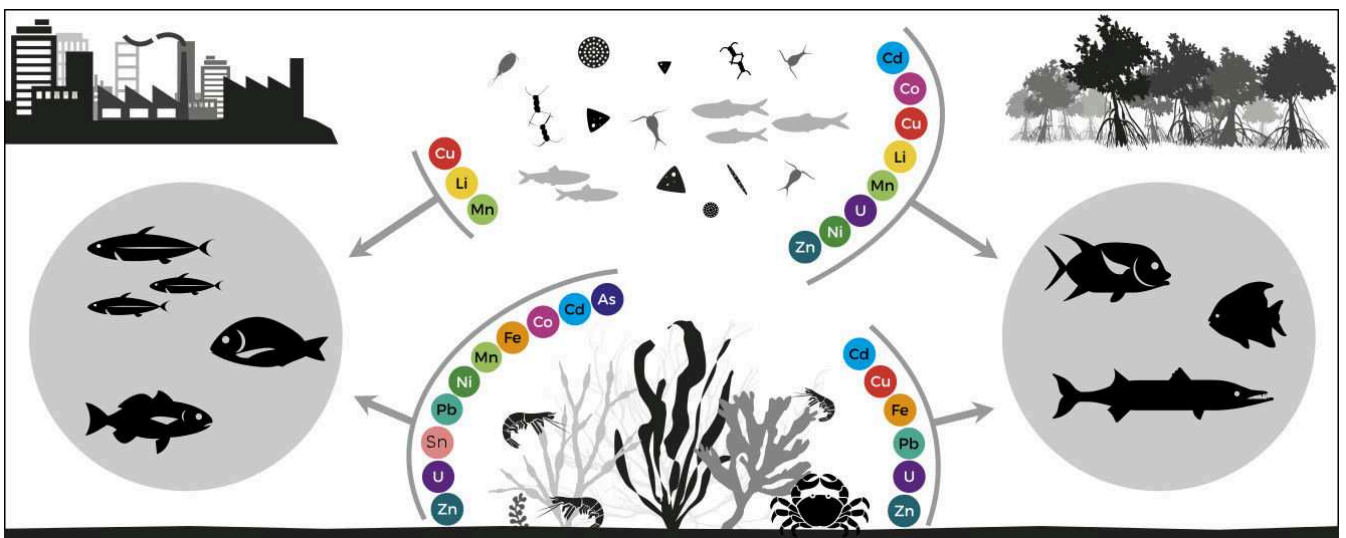
---

L'assimilation des métaux par les consommateurs marins a principalement lieu par voie trophique (Creighton et Twining, 2010a; Mathews et Fisher, 2009a). De par la grande diversité de concentrations métalliques retrouvées parmi les organismes marins, le type de proies consommées par les poissons constitue un paramètre déterminant dans leur exposition aux métaux (Metian et al., 2013). Certaines espèces se caractérisent par un régime alimentaire opportuniste, pouvant conduire à une forte variabilité intraspécifique en termes de bioaccumulation (Das et al., 2000). Les isotopes stables de l'azote et du carbone (IS) sont couramment utilisés pour évaluer la niche trophique des espèces marines, permettant de déterminer le niveau trophique via le calcul du  $\delta^{15}\text{N}$  et de discriminer des habitudes alimentaires benthiques *versus* pélagiques ou côtières *versus* océaniques via le  $\delta^{13}\text{C}$  (Layman et al., 2012). Les IS ne permettent cependant qu'une vision en deux dimensions et peuvent présenter des limites dans la caractérisation de sources pourtant différentes mais aux signatures isotopiques trop proches. Ainsi, leur couplage à l'analyse des acides gras (AG) des lipides de réserve est de plus en plus utilisé dans l'étude de l'écologie trophique des poissons marins (Farias et al., 2014; Stowasser et al., 2012).

Ce chapitre se propose de déterminer le degré d'exposition aux métaux de poissons provenant du courant des Canaries, en fonction de leurs préférences alimentaires individuelles. Deux sites contrastés en termes de pression anthropique ont été échantillonnés le long des côtes du Sénégal. Alors que la région de Dakar est soumise à des rejets métalliques urbains et industriels (Diop et al., 2015), la Casamance est présumée moins impactée par les activités humaines. Les concentrations en 13 éléments métalliques ont été mesurées dans le foie de 6 espèces différentes pour chaque station. Au sein de chaque site, 3 groupes trophiques ont été établis sur la base des compositions isotopiques (mesurées dans le muscle) et lipidiques (mesurées dans le foie) des individus.

Pour de nombreux éléments métalliques, les informations apportées par les IS et les AG ont confirmé le lien entre composition des proies et exposition, déduite des concentrations en métaux accumulés. Les AG ont cependant permis une meilleure caractérisation des voies de transfert trophique des métaux comparé aux IS. Dans la région soumise aux rejets

anthropiques, l'exposition métallique des poissons passe majoritairement par la consommation de proies benthiques alors que dans la région moins impactée, les proies pélagiques représentent également un vecteur de contamination. Ces résultats montrent le forçage des activités anthropiques sur les voies de transfert des métaux au sein des écosystèmes marins, avec dans le cas de Dakar, une contamination des sédiments côtiers entraînant une entrée des éléments dans le réseau trophique par le biais des organismes benthiques. Enfin, parmi les chaînes trophiques pélagiques des deux sites, celles basées sur des communautés de microphytoplancton (majoritairement des diatomées et dinoflagellés) augmentent le transfert métallique jusqu'aux poissons, en comparaison des chaînes soutenues par des espèces nano et picoplanctoniques. Cette observation semble résulter de différences d'assimilation des métaux entre les consommateurs primaires à la base des réseaux trophiques pélagiques (Twining et al., 2015; Twining et Baines, 2013).



## 2. ARTICLE N° 3

---

# TROPHIC ECOLOGY INFLUENCE ON METAL BIOACCUMULATION IN MARINE FISH: INFERENCE FROM STABLE ISOTOPES AND FATTY ACID ANALYSES

Gaël Le Croizier<sup>1</sup>, Gauthier Schaal<sup>1</sup>, Régis Gallon<sup>1</sup>, Massal Fall<sup>2</sup>, Fabienne Le Grand<sup>1</sup>, Jean-Marie Munaron<sup>1</sup>, Marie-Laure Rouget<sup>3</sup>, Eric Machu<sup>4</sup>, François Le Loc'h<sup>1</sup>, Raymond Laë<sup>1</sup>, Luis Tito De Morais<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/IFREMER, BP 70, 29280 Plouzané, France

<sup>2</sup>Centre de Recherches Océanographiques de Dakar-Thiaroye (CRODT/ISRA), BP 2241, Dakar, Sénégal

<sup>3</sup>Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), Université de Bretagne Occidentale (UBO), CNRS UMS 3113, 29280 Plouzané, France

<sup>4</sup>Laboratoire d'Océanographie Physique et Spatiale (LOPS), UMR 6523 CNRS/IFREMER/IRD/UBO, BP70, 29280 Plouzané, France

## Abstract

The link between trophic ecology and metal accumulation in marine fish species was investigated through a multi-tracers approach combining fatty acid (FA) and stable isotope (SI) analyses on fish from two contrasted sites on the coast of Senegal, one subjected to anthropogenic metal effluents and another one less impacted. The concentrations of thirteen trace metal elements (As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Ni, Pb, Sn, U, and Zn) were measured in fish liver. Individuals from each site were classified into three distinct groups according to their liver FA and muscle SI compositions. Trace element concentrations were tested between groups revealing that bioaccumulation of several metals was clearly dependent on the trophic guild of fish. Furthermore, correlations between individual trophic markers and trace metals gave new insights into the determination of their origin. Fatty acids revealed relationships between the dietary regimes and metal accumulation that were not detected with stable isotopes, possibly due to the trace metal elements analysed in this study. In the region exposed to metallic inputs, the consumption of benthic preys was the main pathway for metal transfer to the fish community while in the unaffected one, pelagic preys represented the main source of metals. Within pelagic sources, metallic transfer to fish depended on phytoplankton taxa on which the food web was based, suggesting that microphytoplankton (*i.e.*, diatoms and dinoflagellates) were a more important source of exposition than nano- and picoplankton. This study confirmed the influence of diet in the metal accumulation of marine fish communities, and proved that FAs are very useful and complementary tools to SIs to link metal accumulation in fish with their trophic ecology.

**Keywords** Trace elements, biochemical tracers, diet, contamination, Senegal, tropical fish.



## Introduction

Increasing concerns regarding metal contamination in marine ecosystems, from both natural and anthropogenic sources, require a better comprehension of the mechanisms that drive their accumulation in organisms. Marine fish are exposed to metals via two major pathways, and even if they can assimilate dissolved metals through their gills (Jeffree et al. 2006), the main pathway is thought to be through feeding (Mathews and Fisher 2009). Because marine organisms display a wide range of accumulation patterns, trophic metal inputs therefore depend on the type of prey consumed by marine fish. Furthermore, it has been reported that fish sharing the same habitat do not necessarily share the same levels of metal accumulation (Barhoumi et al., 2009; Siscar et al., 2013), which suggests that considering the feeding habitat (e.g., benthic vs. pelagic and coastal vs. oceanic) of fish is not a sufficient approach to understand how metals are introduced to fish communities. More accurate methods aiming to characterise the trophic ecology of fish communities are therefore necessary to understand the factors affecting metal bioaccumulation. Studies investigating the link between trophic ecology and metal bioaccumulation report that an organism's metal content is not only dependant on trophic groups, but that this relationship is variable according to the metal considered (Domi et al., 2005; Metian et al., 2013). Moreover, some species can present intraspecific differences in diet, which are reflected in metal accumulation (Das et al., 2000). This highlights the need to apply trophic studies at the individual level to better understand the bioaccumulation drivers.

Over recent years, stable isotope analysis has become a very popular approach to investigate the structure of marine food webs (Valiela, 2015). Among the different strengths of this method for fish communities is the possibility to characterise trophic levels using nitrogen isotopes ( $\delta^{15}\text{N}$ ) or to discriminate benthic vs. pelagic or continental vs. oceanic inputs to the food webs using carbon isotopes ( $\delta^{13}\text{C}$ ).

Because stable isotope analysis only provides a two-dimensional discrimination and sometimes fails to discriminate among isotopically similar sources, coupling this approach with fatty acid (hereafter FA) composition analysis has recently been suggested as a solution for a thorough understanding of marine fish trophic ecology (Stowasser et al., 2009; Couturier et al., 2013; Farias et al., 2014). Because different primary producers synthesise

different fatty acids and consumers cannot efficiently synthesise them, the composition of FAs reflects the basis of food webs. FA composition analysis has therefore allowed identification of the respective roles of diatoms, dinoflagellates, bacteria or plant detritus in marine food webs (Dalsgaard et al., 2003; Kelly and Scheibling, 2012). Although a number of studies linking stable isotope composition with metal-exposed species have been published (Das et al., 2000; Domi et al., 2005; Chouvelon et al., 2012; Pethybridge et al., 2012), to our knowledge, no study has ever tried to link the metal content in fish tissues with FA trophic markers, except for mercury (McMeans et al., 2015). Furthermore, in contrast to stomach content analysis, these tracers can provide time-integrated information on the dietary habits of the fish for the last few months (Buchheister and Latour, 2010; Beckmann et al., 2014). This time scale is thus more relevant to study the chronic trophic metal exposition because trace elements can take several weeks to accumulate (Berntssen et al., 2001; Kim et al., 2006).

To investigate the link between trophic ecology and metal accumulation, a case study of the Canary Current Large Marine Ecosystem (CCLME) in Western Africa was chosen. This ecosystem is one of the world's major cold-water upwelling currents and includes several countries from Morocco to Guinea including Senegal. It ranks third in the world in terms of primary productivity (Chavez and Messié, 2009) and supports one of the largest fisheries among African large marine ecosystems. These fisheries provide food to local populations but also to foreign countries through the attribution of fishing licences and exportation. This marine ecosystem is prone to metal contamination due to urban effluents and industrial activities (Auger et al., 2015; Diop et al., 2015), including phosphate extraction, which is of special importance for this region (Jasinski, 2015).

Although metals of anthropogenic origin are known to accumulate in marine sediments, they can become available to marine organisms through resuspension processes, in particular due to upwelling activity. Several studies have reported the presence of metals, such as cadmium, in invertebrates from Morocco (Banaoui et al., 2004), Mauritania (Everaarts et al., 1993; Sidoumou et al., 1999) and Senegal (Bodin et al., 2013). Concerning fish communities, although some data are available for the northern part of the CCLME (Roméo et al., 1999; Sidoumou et al., 2005; Chahid et al., 2014), only recent studies have investigated the metal content in fish from the coast of Senegal (Diop et al., 2016a, 2016b). Improved knowledge in

this area is of special importance because coastal sediments and waters from this area are known to be impacted by toxic metals such as cadmium, chromium, nickel and lead (Diop et al., 2012, 2014; Bodin et al., 2013; Diop et al., 2015).

In the present study, a multi-tracers approach combining fatty acid and stable isotope analyses was used to investigate the trophic ecology of different fish species from the coast of Senegal. In addition, a metal content analysis was performed on the liver, which is known to be an organ highly involved in metal bioaccumulation by marine fish (Berntssen et al., 2001; Kim et al., 2006; Siscar et al., 2014).

The main objective of this work was to study the repartition of metals between different fish groups characterised by different trophic marker compositions. In addition, correlations between these tracers and trace metal elements were investigated to better understand the pathways leading to the contamination of fish communities.

## **Material and methods**

### **Study area and sampling**

Two sites that were presumed to be impacted differently by metallic contamination were selected (Fig. 1).

The first one was located in the offshore area of Dakar Bay, where urban and industrial wastewaters are directly discharged into the bay (Diop et al., 2012, 2014; Diop et al., 2015).

The second one was located off the Casamance River Estuary, at the extreme southern area of Senegal. Although there are no existing data on metal concentration in marine organisms for this region, this place was considered to be less impacted because of the absence of large cities and/or significant industrial activity.

The samples were collected during the AWA project (Ecosystem Approach to the management of fisheries and the marine environment in West African waters) scientific cruise in March 2014 aboard the RV *Thalassa*. The fish were caught with a bottom trawl net, packed in plastic bags and frozen on board at -20 °C. Once at the laboratory, the fish were weighed (wet weight) and measured (total length) (Table 1). They were then dissected with ceramic tools to avoid metal contamination, and the liver and a piece of dorsal muscle (a

standardised cut on the dorsal muscle just behind the head) were collected. The liver was split into two samples, one for trace metal analysis and one for the fatty acid composition analysis. Stable isotope analyses were conducted on dorsal muscle samples only. Five replicates were analysed for each species and for each type of analysis.

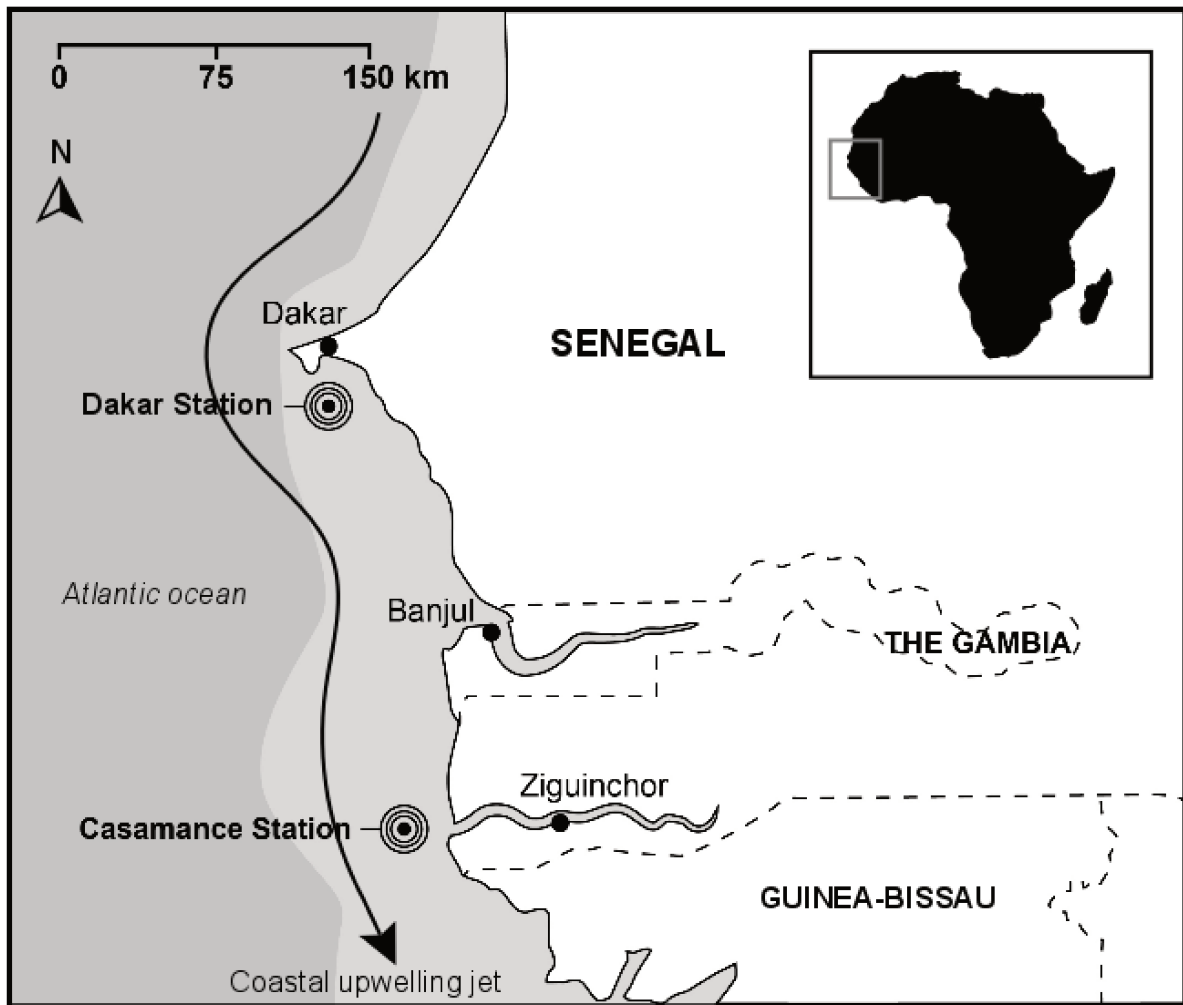


Figure 22 A map showing the two sample stations along the coast of Senegal.

Station	Family	Species	TL	n	Total length (cm)	Wet weight
Dakar	Sparidae	<i>Boops boops</i>	3	5	18.7 ± 1.6	63.7 ± 2.2
	Carangidae	<i>Caranx rhonchus</i>	3.6	4	19.9 ± 1.4	91.3 ± 13.1
	Sparidae	<i>Diplodus bellottii</i>	3.5	5	21.1 ± 1.8	77.9 ± 8.7
	Mullidae	<i>Pseudupeneus prayensis</i>	3.2	5	21.4 ± 1.1	120.6 ± 15.0
	Scombridae	<i>Scomber japonicus</i>	3.4	5	16.2 ± 0.6	32.9 ± 5.2
	Carangidae	<i>Trachurus trecae</i>	3.5	5	21.8 ± 0.4	100.0 ± 4.8
Casamance	Haemulidae	<i>Brachydeuterus auritus</i>	3	5	20.8 ± 0.4	127.0 ± 5.0
	Carangidae	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	3.5	5	20.3 ± 1.2	72.2 ± 10.6
	Carangidae	<i>Caranx rhonchus</i>	3.6	5	32.9 ± 3.0	334.4 ± 68.8
	Polynemidae	<i>Galeoides decadactylus</i>	3.6	5	17.6 ± 1.3	63.0 ± 16.1
	Carangidae	<i>Selene dorsalis</i>	4.1	5	24.4 ± 1.3	170.0 ± 22.7
	Sphyraenidae	<i>Sphyraena guachancho</i>	4.4	5	34.4 ± 3.3	197.0 ± 53.6

**Table 10 Summary (mean ± standard deviation) of the biological parameters of fish from Dakar and Casamance. TL: trophic level (Froese and Pauly, 2016); n: number of individuals; Total length in cm; Wet weight in g.**

### Trace metal analysis

Liver samples for trace metal analysis were freeze-dried, ground, and stored in individual plastic vials. Approximately 80 mg of the dried samples were digested in a mixture of 7 ml of 70 % HNO<sub>3</sub> and 1 ml of 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (both of ultrapure quality) in Teflon vessels. Mineralization was performed in a microwave oven (Ethos One, Milestone) during 15 min with increasing temperature until 200 °C, followed by 15 min at 200 °C (1500 W) and 90 min of cooling. The samples were then evaporated on a hotplate at 100 °C, resolubilised with 2 ml of HNO<sub>3</sub>, and diluted to 50 ml with Milli-Q quality water (Merck Millipore). A total of 13 elements: arsenic (As), cadmium (Cd), cobalt (Co), chromium (Cr), copper (Cu), iron (Fe), lithium (Li), manganese (Mn), nickel (Ni), lead (Pb), tin (Sn), uranium (U) and zinc (Zn) were analysed using an ICP Q-MS (X Series 2, Thermo Scientific) at the Pôle de Spectrométrie Océan (PSO, Plouzané, France) with an internal solution of Rhodium. These elements were selected for their reported occurrence in the marine environment of Senegal (Bodin et al., 2013; Diop et al., 2015, 2016). Reference materials (fish protein DORM-4 and lobster hepato-pancreas TORT-2, NRCC) were treated and analysed in the same way as the samples. The results for reference materials displayed mean element recoveries ranging from 84 % to 132 % for

DORM-4 and 89 % to 131 % for TORT-2. Blanks were included in each analytical batch. The detection limits ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dry wt) were 0.001 (Ni), 0.003 (Co), 0.016 (As, Pb), 0.017 (U), 0.018 (Cr), 0.054 (Li), 0.133 (Cu), 0.15 (Cd), 0.19 (Mn), 0.278 (Zn), 1.61 (Sn) and 17.83 (Fe). All of the element concentrations (ppm) are provided as a dry weight basis ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dry wt).

## Stable isotopes

The muscle samples for the analysis of stable isotopes were freeze-dried and ground into a fine and homogeneous powder. Approximately 350  $\mu\text{g}$  of powder was then weighed in tin capsules for isotopic analysis. The samples were analysed by continuous flow on a Thermo Scientific Flash EA 2000 elemental analyser coupled to a Delta V Plus mass spectrometer at the Pôle de Spectrométrie Océan (PSO, Plouzané, France). The results are expressed in standard  $\delta$  notation based on international standards (Vienna Pee Dee Belemnite for  $\delta^{13}\text{C}$  and atmospheric nitrogen for  $\delta^{15}\text{N}$ ) following the equation :

$$\delta^{13}\text{C} \text{ or } \delta^{15}\text{N} = [(R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}})-1] \times 10^3 \text{ (in ‰)}, \text{ where } R \text{ is } ^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ or } ^{15}\text{N}/^{14}\text{N}.$$

The samples were not delipidated, because muscle generally contains a lower amount of lipids than other organs in fish (Njinkoué et al., 2002). However, since lipid content can impact  $\delta^{13}\text{C}$ , C/N ratios were measured. They exceeded 3.5 for a few samples (Supplementary material) and therefore a mathematical normalisation was applied, following the equation  $\delta^{13}\text{C}_{\text{normalised}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{untreated}} - 3.32 + 0.99 \cdot \text{C/N}$  (Post et al., 2007).

International isotopic standards of known  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  were used: IAEA-600 Caffeine, IAEA-CH-6 Sucrose, IAEA-N-1 and IAEA-N-2 Ammonium Sulphate. A home standard (Thermo Acetanilide) was used for experimental precision (based on the standard deviation of the replicates of the internal standard) and indicated an analytical precision of  $\pm 0.11$  ‰ for  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\pm 0.07$  ‰ for  $\delta^{15}\text{N}$ .

## Fatty acids

### Lipid extraction

After dissection, the liver samples (approximately 300 mg each) were immediately put in glass tubes previously heated for 6 h at 450 °C and containing 6 mL of a

chloroform/methanol mixture (2/1, v/v), flushed with nitrogen and stored at -20 °C before analysis. The samples were then manually ground in the mixture with a Dounce homogeniser and vortexed.

### **Separation**

Neutral lipids were isolated following the method used by Le Grand et al. (2014). An aliquot of total lipid extract (1 mL) was evaporated to dryness under nitrogen, recovered with three 0.5-mL washings of chloroform/methanol (98/2, v/v) and deposited at the top of a silica gel micro-column (Pasteur pipette of 40 mm × 5 mm i.d., plugged with glass wool and filled with silica gel 60, which were both previously heated for 6 h at 450 °C and deactivated with 6% water by weight). Only neutral lipids (NL), including triglycerides, free fatty acids and sterols, were eluted with 10 mL of chloroform/methanol (98/2, v/v) and collected in 20-mL glass vials. After evaporation to a dryness under nitrogen, the NL fraction was recovered and transferred to 7-mL vials with three 1-mL washings of chloroform/methanol (98/2, v/v).

### **Transesterification**

After the addition of tricosanoic acid (23:0) as an internal standard and evaporation to dryness under nitrogen, the fatty acid methyl esters (FAME) were obtained using a method modified from Le Grand et al. (2014). A total of 0.8 mL of a sulphuric acid solution (3.8 % in methanol) was added, vortexed and heated for 10 min at 100 °C. Before gas chromatography analysis, 0.8 mL of hexane was added and the organic phase containing FAME was washed three times with 1.5 mL of hexane-saturated distilled water. The organic phase was finally transferred to tapering vials and stored at -20 °C.

### **Gas chromatography analysis**

FAMEs were analysed in a Varian CP 8400 gas chromatograph equipped with a split/splitless injector and a flame-ionization detector. FAMEs were identified using two different capillary columns (ZBWAX - 30 m × 0.25 mm i.d., 0.25-µm thickness, Phenomenex; and ZB-5HT - 30 m × 0.25 mm i.d., 0.25-µm thickness, Phenomenex) by means of a standard 37-component

FAME mix (Sigma) and other known standard mixtures. The FAs were expressed as the molar percentage of the total FA content.

## **Data analyses**

Only FAs accounting for  $\geq 0.5$  % of total FA in at least one fish sample were included in the data analyses. The groups inferred by stable isotope and fatty acid analyses were derived from the result of a hierarchical cluster analysis (Ward's clustering method). Similarity of percentages analyses (SIMPER) were used to identify the fatty acids that were the most discriminant between the groups. Principal component analyses (PCA) were performed to investigate the variation in fatty acids profiles between individual fish from the same community. The groups derived from the result of the clustering and FAs accounted for more than 75 % of the dissimilarity contribution between the groups in the SIMPER routine and were shown in the PCA.

All of the data submitted to the statistical tests were first checked for normality (Shapiro-Wilks test) and for homogeneity of variances (Bartlett test). When these conditions were satisfied, parametric tests were used in the subsequent analysis; otherwise, non-parametric analogues were used. Pearson and Spearman correlation coefficient tests were used to investigate the correlation between the variables (stable isotopes, fatty acids and metal concentrations). Significance of the RV correlation coefficient, which is a multivariate generalisation of the Pearson correlation coefficient, was tested by permutation to measure the closeness of the SI and FA matrices.

One-way ANOVAs followed by Tukey's HSD tests, and Kruskal-Wallis (KW) tests followed by Conover-Iman multiple comparison tests with Bonferroni's adjustment method, were performed to test differences between groups in muscle  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  values, and in metal concentration for each element. All of the statistical analyses were performed using the free software R (R Development Core Team 2010).



## Results

### Stable isotopes

The stable isotope ( $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$ ) composition of fish from the region of Dakar highlighted three main groups (Fig. 2A). These three groups were significantly different in their  $\delta^{15}\text{N}$  (KW test,  $p < 0.001$ ). The first one contained only individuals of the chub mackerel *Scomber japonicus*. This group displayed the lowest  $\delta^{15}\text{N}$  (from 7.8 to 8.5 ‰) and lower  $\delta^{13}\text{C}$  (-17.2 to -16.3 ‰) than group three (ANOVA,  $p < 0.001$ ).

The second group was characterised by intermediate  $\delta^{15}\text{N}$  (9.9 to 11.2 ‰) and also lower  $\delta^{13}\text{C}$  (-16.7 to -14.7 ‰) than group three (ANOVA,  $p < 0.001$ ). This second group included all individuals of the bogue *Boops boops* and the Cunene horse mackerel *Trachurus trecae* and one individual of the West African goatfish *Pseudupeneus prayensis*. The third group showed both the highest  $\delta^{15}\text{N}$  (11.4 to 12.9 ‰) and the highest  $\delta^{13}\text{C}$  (-15.9 to -14.5 ‰). This third group included all individuals of the Senegal seabream *Diplodus bellottii* and the false scad *C. rhonchus*, and most *P. prayensis* individuals.

Samples from Casamance were also classified into three groups (Fig. 2B). The first one was mainly composed of individuals of the Atlantic bumper *Chloroscombrus chrysurus* and had lower  $\delta^{13}\text{C}$  (-17.2 to -16.0 ‰) than other groups (ANOVA,  $p < 0.001$ ) and lower  $\delta^{15}\text{N}$  (12.3 to 13.7 ‰) than group two. This last group was characterised by higher  $\delta^{13}\text{C}$  (-16.2 to -14.8 ‰) than group one and higher  $\delta^{15}\text{N}$  (14.0 to 14.7 ‰) than the other groups. The composition of this group was heterogeneous and included fish from the six species analysed except from the Lesser African threadfin *Galeoides decadactylus*. Group three had similar  $\delta^{15}\text{N}$  (12.4 to 13.7 ‰) but higher  $\delta^{13}\text{C}$  (-15.9 to -15.2 ‰) than group one and similar  $\delta^{13}\text{C}$  but lower  $\delta^{15}\text{N}$  than group two. It mainly included individuals from *C. rhonchus* and *G. decadactylus*.

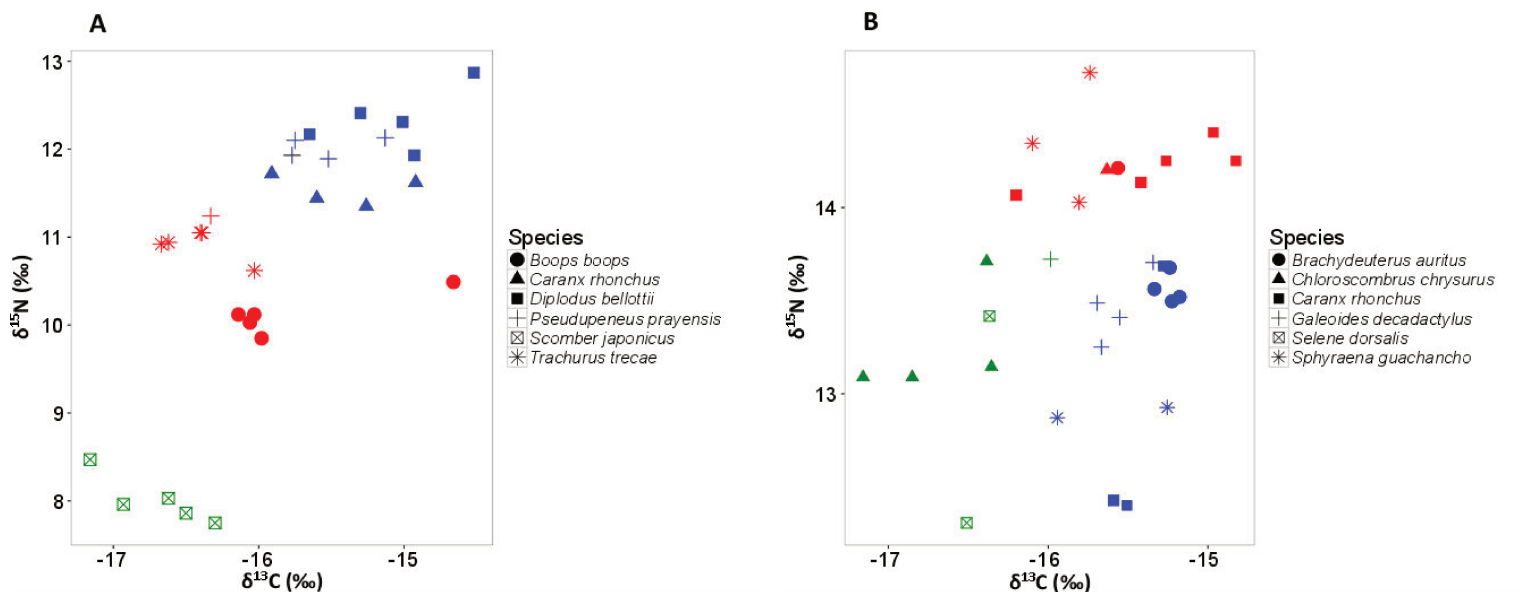


Figure 23 Muscle  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  values (‰) of individuals from six species from Dakar (A) and from Casamance (B). The groups were derived from the result of a hierarchical cluster analysis (Ward's method). Group one is shown in green, group two in red and group three in blue in each region.

### Fatty acid analysis

For the fish community of both Dakar and Casamance, a total of 34 fatty acids represented more than 0.5 % of the total FA in at least one sample and were therefore considered for further analysis.

A hierarchical cluster analysis (Ward's clustering method) allowed the clear separation of three groups in Dakar based on their global FA composition. Group one (composed of *T. trecae*) was characterised by a lower proportion of saturated fatty acids (SFAs) and a higher proportion of poly-unsaturated fatty acids (PUFAs), which accounted for half of the total fatty acids, than the other groups (Table 2). Group two (*B. boops*, *D. Bellottii*, *P. prayensis*) presented an intermediate amount of SFAs but the highest content of mono-unsaturated fatty acids (MUFAs) and the lowest of PUFAs. Group three (*C. rhonchus*, *D. Bellottii*, *P. Prayensis*) showed the highest content of SFAs and intermediate levels of MUFAs. The FA distribution within SFAs and PUFAs did not differ strongly between the different groups. The most important individual FAs were 16:0, 18:0, and 14:0 for SFAs and 20:5n-3, 22:6n-3, and 22:5n-3 for PUFAs. However, MUFA partitioning was rather different with 16:1n-7, 18:1n-9,

and 22:1n-11 dominating group one, whereas 18:1n-9, 16:1n-7, and 18:1n-7 were the most abundant in groups two and three.

The principal component analysis (Fig. 3A) shows the separation between the three groups in Dakar and the fatty acids responsible for the inter-group differences. Group one contained all *S. japonicus* and was characterised by an abundance of 22:1n-11 and n-3 PUFAs such as 20:5n-3, 22:5n-3 and 22:6n-3. The second group was mostly characterised by its high amount of 16:0, 18:1n-9 and to a lesser extent 22:1n-11 and 16:1n-7. It included all of the *T. trecae* and *C. rhonchus* and three individuals from *B. boops*. The third group showed a dominance of various fatty acids such as 16:0, 18:0, 18:1n-7 and 20:4n-6. All of the *D. bellottii* and *P. prayensis* individuals were in this group, along with the two individuals of *B. boops*. All of the individuals of the same species were classified in one group, except *B. boops*, which was split between two groups.

Fish from Casamance were also clearly separated into three groups by the hierarchical cluster analysis, but all the species were split into two groups. The repartition of fatty acids between the different classes was less variable from one group to another in this region. Indeed, similar contents of SFAs were found between the groups with group one only differing from the others by a lower amount of MUFAs and higher amount of PUFAs (Table 3). The dominant FAs within the SFA class were 16:0, 18:0 and 14:0, and within the MUFAs, they were 18:1n-9, 16:1n-7 and 18:1n-7. The PUFAs were mostly composed of 22:6n-3, 20:5n-3 and 22:5n-3 in groups one and two and of 20:5n-3, 22:6n-3 and 20:4n-6 in group three.

The principal component analysis (Fig. 3B) highlighted that the first group was discriminated by the n-3 PUFAs 22:6n-3, 20:5n-3 and 22:5n-3 and to a lesser extent by 18:0. Group two was mostly characterised by 18:1n-9. Group three was discriminated from the other groups by its contents of 16:1n-7, 18:1n-7 and 16:0. Only two species, *C. chrysurus* in group one and *G. decadactylus* in group three, were classified in only one group. This demonstrates the high intra-specific variability in terms of trophic markers existing within the species sampled at this location.

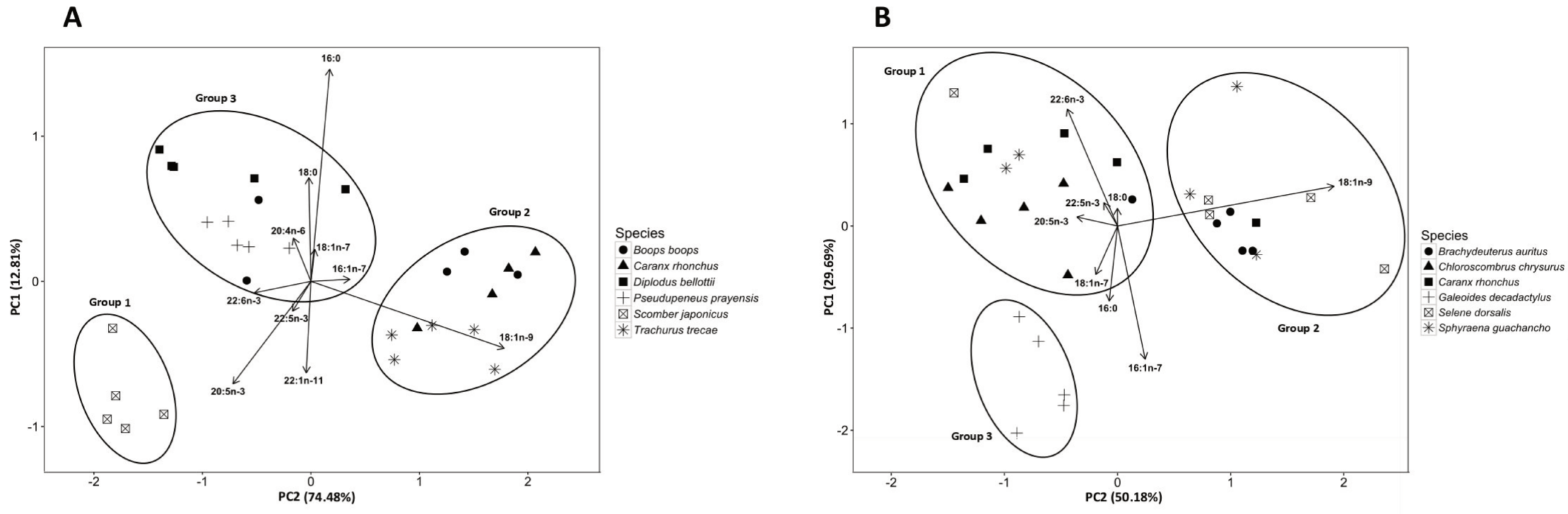


Figure 24 Principal component analysis (PCA) of the fatty acid composition of the liver of six fish species from Dakar (A) and from Casamance (B). The trophic groups (circled) were derived from the result of a hierarchical cluster analysis (Ward's clustering method). Fatty acids that account for more than 75 % of the contribution of dissimilarity between the groups in the similarity of percentages analysis (SIMPER) are shown.

FA	Group			FA	Group		
	1	2	3		1	2	3
TMTD	0.5 ± 0.2 <sup>b</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	iso17:0	0.6 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.2 <sup>b</sup>	0.7 ± 0.2 <sup>a</sup>
iso17:0	0.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.1 ± 0.5 <sup>a</sup>	14:0	1.9 ± 1.2 <sup>a</sup>	1.7 ± 0.5 <sup>a</sup>	4.0 ± 1.0 <sup>b</sup>
ant17:0	0.1 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.2 <sup>b</sup>	15:0	0.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.3 ± 0.0 <sup>a</sup>
14:0	2.8 ± 0.6	2.8 ± 0.7	2.7 ± 1.8	16:0	19.7 ± 4.2	19.2 ± 4.0	23.8 ± 4.6
15:0	0.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.7 ± 0.2 <sup>c</sup>	17:0	0.7 ± 0.3 <sup>b</sup>	0.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.1 <sup>a</sup>
16:0	14.5 ± 1.5 <sup>b</sup>	20.5 ± 2.3 <sup>a</sup>	22.7 ± 1.4 <sup>a</sup>	18:0	6.4 ± 2.1 <sup>a</sup>	5.8 ± 1.2 <sup>ab</sup>	4.5 ± 0.5 <sup>b</sup>
17:0	0.9 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.3 ± 0.5 <sup>a</sup>	∑ SFA	29.8 ± 6.8	27.4 ± 4.7	33.7 ± 5.5
18:0	4.3 ± 1.0 <sup>a</sup>	6.0 ± 0.9 <sup>a</sup>	7.9 ± 1.7 <sup>b</sup>	14:1n-5	0.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.3 <sup>ab</sup>	0.5 ± 0.2 <sup>b</sup>
∑ SFA	23.9 ± 1.6 <sup>a</sup>	30 ± 2.5 <sup>b</sup>	36.8 ± 4.0 <sup>c</sup>	16:1n-13t	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.0
16:1n-7	5.1 ± 1.2 <sup>a</sup>	8.6 ± 3.0 <sup>b</sup>	5.9 ± 2.4 <sup>a</sup>	16:1n-9	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.4	0.3 ± 0.1
17:1n-8	0.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.1 <sup>ab</sup>	0.5 ± 0.2 <sup>b</sup>	16:1n-7	6.1 ± 2.6 <sup>a</sup>	10.3 ± 3.7 <sup>b</sup>	16.3 ± 3.5 <sup>c</sup>
18:1n-11	0.9 ± 0.6 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	16:1n-5	0.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.1 <sup>b</sup>
18:1n-9	3.8 ± 1.2 <sup>a</sup>	24.9 ± 3.1 <sup>b</sup>	8.5 ± 3.3 <sup>c</sup>	17:1n-8	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1
18:1n-7	3.0 ± 0.5 <sup>a</sup>	4.0 ± 1.0 <sup>ab</sup>	4.6 ± 1.0 <sup>b</sup>	18:1n-9	13.4 ± 4.1 <sup>a</sup>	28.0 ± 3.4 <sup>b</sup>	11.5 ± 1.6 <sup>a</sup>
20:1n-9	1.8 ± 0.6 <sup>a</sup>	1.4 ± 0.9 <sup>ab</sup>	0.6 ± 0.5 <sup>b</sup>	18:1n-7	4.2 ± 0.8 <sup>a</sup>	3.8 ± 1.0 <sup>a</sup>	9.9 ± 2.2 <sup>b</sup>
22:1n-11	3.4 ± 1.6 <sup>a</sup>	1.6 ± 1.7 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.6 <sup>b</sup>	20:1n-9	1.0 ± 0.3 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.3 <sup>ab</sup>	0.5 ± 0.1 <sup>b</sup>
22:1n-9	0.5 ± 0.2 <sup>b</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	20:1n-7	0.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.1 <sup>b</sup>
∑ MUFA	18.7 ± 3.6 <sup>a</sup>	41.1 ± 3.9 <sup>b</sup>	20.8 ± 5.4 <sup>a</sup>	22:1n-11	0.5 ± 0.4	0.4 ± 0.4	0.2 ± 0.1
16:2n-4	0.5 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.1	∑ MUFA	26.7 ± 5.5 <sup>a</sup>	45.0 ± 4.7 <sup>b</sup>	41 ± 1.6 <sup>b</sup>
16:3n-4	0.4 ± 0.3	0.4 ± 0.2	0.2 ± 0.1	16:2n-4	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.0
16:3n-6	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.4 ± 0.5	16:3n-4	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1
16:4n-1	0.8 ± 0.3 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.3 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>b</sup>	16:4n-3	0.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.2 ± 0.2 <sup>ab</sup>
18:2n-6	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.2	16:4n-1	0.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>ab</sup>
18:2n-4	0.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	18:2n-9	0.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.4 <sup>b</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>ab</sup>
18:3n-4	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	18:2n-6	1.3 ± 0.3 <sup>b</sup>	0.6 ± 0.3 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.1 <sup>a</sup>
18:3n-3	0.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.2 <sup>b</sup>	0.3 ± 0.1 <sup>b</sup>	18:3n-4	0.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>ab</sup>
18:4n-3	1.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.3 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.2 <sup>b</sup>	18:3n-3	0.7 ± 0.3 <sup>b</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.1 <sup>a</sup>
18:5n-3	1.3 ± 0.7 <sup>b</sup>	0.4 ± 0.3 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	18:4n-3	1.3 ± 1.6 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.2 <sup>b</sup>	0.7 ± 0.2 <sup>ab</sup>
20:4n-6	2.0 ± 1.1 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.2 <sup>b</sup>	2.9 ± 0.8 <sup>a</sup>	18:5n-3	0.2 ± 0.3	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.1
20:4n-3	1.2 ± 0.2 <sup>b</sup>	0.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	20:4n-6	2.0 ± 0.8 <sup>a</sup>	1.5 ± 0.4 <sup>ab</sup>	1.1 ± 0.2 <sup>b</sup>
20:5n-3	20.0 ± 1.5 <sup>a</sup>	9.2 ± 1.4 <sup>b</sup>	13.3 ± 2.3 <sup>c</sup>	20:4n-3	0.9 ± 0.3 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.1 <sup>a</sup>
21:5n-3	0.7 ± 0.3	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1	20:5n-3	9.5 ± 1.6 <sup>a</sup>	6.8 ± 1.8 <sup>b</sup>	9.2 ± 2.4 <sup>ab</sup>
22:4n-6	0.5 ± 0.3 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.7 ± 0.3 <sup>a</sup>	21:5n-3	0.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.4 ± 0.1 <sup>a</sup>
22:5n-6	0.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.6 ± 0.2 <sup>c</sup>	22:4n-6	0.5 ± 0.4 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>b</sup>
22:5n-3	4.9 ± 1.2 <sup>a</sup>	2.3 ± 0.6 <sup>b</sup>	3.1 ± 0.6 <sup>c</sup>	22:5n-3	3.5 ± 1.5 <sup>b</sup>	1.8 ± 0.7 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.3 <sup>a</sup>
22:6n-3	14.2 ± 4.2 <sup>a</sup>	7.5 ± 1.6 <sup>b</sup>	11.1 ± 3.3 <sup>a</sup>	22:6n-3	14.2 ± 2.9 <sup>a</sup>	9.0 ± 2.7 <sup>b</sup>	4.7 ± 1.1 <sup>c</sup>
∑ PUFA	50.4 ± 3.0 <sup>a</sup>	25.2 ± 4.0 <sup>b</sup>	36.4 ± 5.4 <sup>c</sup>	∑ PUFA	35.9 ± 4.1 <sup>b</sup>	23.2 ± 5.3 <sup>a</sup>	20.1 ± 4.7 <sup>a</sup>
∑ BAFA	1.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.2 <sup>b</sup>	3.4 ± 1.0 <sup>c</sup>	∑ BAFA	1.8 ± 0.7 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.3 <sup>b</sup>	1.4 ± 0.3 <sup>a</sup>
∑ n-3	55.4 ± 4.0 <sup>b</sup>	33.22 ± 6.7 <sup>a</sup>	37.8 ± 3.9 <sup>a</sup>	∑ n-3	30.9 ± 4.3 <sup>b</sup>	19.4 ± 4.8 <sup>a</sup>	17.3 ± 4.2 <sup>a</sup>
∑ n-6	3.7 ± 1.7 <sup>a</sup>	1.7 ± 0.3 <sup>b</sup>	5.3 ± 1.3 <sup>a</sup>	∑ n-6	3.8 ± 1.0 <sup>b</sup>	2.6 ± 0.6 <sup>a</sup>	2.0 ± 0.4 <sup>a</sup>
20:5n-3/22:6n-3	1.4	1.2	1.2	20:5n-3/22:6n-3	0.7	0.8	2

Table 11 Fatty acid composition (mean ± SD, %) of liver tissue of the three groups derived from the result of a hierarchical cluster analysis (Ward's method) from Dakar (left panel) and Casamance (right panel). Only FAs accounting for ≥ 0.5% of total FA in at least one fish sample are shown. Different letters indicate significant differences between the groups (ANOVAs followed by Tukey's HSD tests or KW tests followed by multiple comparison tests).

## Trace metal analysis

For some of the trace elements analysed, the concentrations in the liver of the fish sampled in Dakar varied significantly between the groups identified from the stable isotope (SI groups) and the fatty acid (FA groups) analyses (Fig. 4A). All the differences discussed below were statistically significant ( $p < 0.05$ ). In the SI groups, a lower level of Li (0.09 ppm dw) was found in group three than in other groups (0.45 ppm dw for group one and 1.95 ppm dw for group two), whereas Pb was more abundant in group three (0.15 ppm dw) compared to group one (0.05 ppm dw). Distribution of the individual fish inferred by stable isotopes and fatty acids were poorly correlated in Dakar ( $RV = 0.19$ ;  $p < 0.05$ ). As a consequence of the differences in the composition of the two types of groups (SI and FA groups), the FA groups showed many other differences in the concentrations of trace elements. Group one displayed a higher level of Mn and Pb than group two. In group three, As, Cd, Co, Fe, Pb and Zn were more abundant than in the two other groups. Likewise, Ni concentration was higher than in group two and Sn concentration was higher than in group one.

In the fish community from Casamance, significant differences also existed between the different groups in terms of the metal concentration in the liver (Fig. 4B). According to the SI groups, only one element varied depending on the trophic preferences. Li was indeed more abundant in group one than in group three. Distributions of the fish through SI and FA analyses were not significantly correlated in Casamance. More differences were also found in the metal contents between the FA groups. Group one displayed higher levels of Co, Cu, Fe, Li, Sn and Zn than group three. Group one also contained more Li than group two. Finally, group two showed more Fe and Zn than group three.

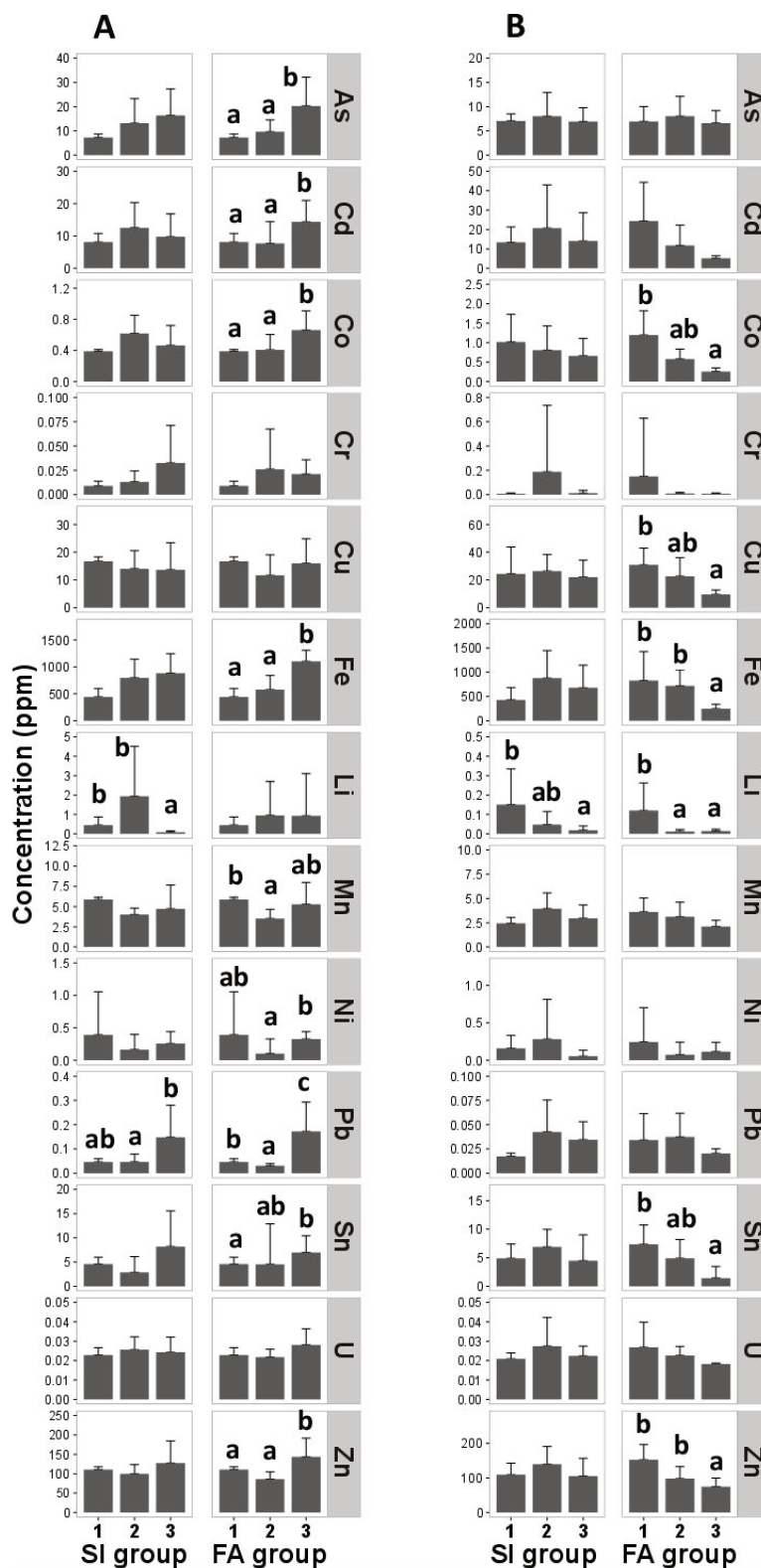


Figure 25 Comparison of the trace element concentrations ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dry wt) in the liver of fish from Dakar (A) and from Casamance (B) according to their trophic group. SI group: trophic groups inferred by stable isotopes; FA group: trophic groups inferred by fatty acids. In each region, FA groups one and two included fish feeding mostly on pelagic prey, whereas FA group three contained fish feeding mostly on benthic prey. Different letters indicate significant differences between groups (ANOVAs followed by Tukey's HSD tests or KW tests followed by multiple comparison tests).

## Correlations between metals and trophic markers

Considering only the relationships that indicated strong correlations (arbitrarily determined for correlation coefficients > 0.5), very few metals were correlated with stable isotope ratios. Fe was positively correlated with  $\delta^{15}\text{N}$  for fish from Dakar (Table 3), whereas Li was negatively correlated with  $\delta^{15}\text{N}$  in Dakar and with  $\delta^{13}\text{C}$  in Casamance (Table 4). Pb was positively correlated with  $\delta^{13}\text{C}$  in Casamance. However, all of the trace metal elements were positively correlated with at least one fatty acid, except Cr in Dakar (Table 3) and As, Cr and Sn in Casamance (Table 4). Zn, Mn and Cu were found to be negatively correlated with 18:1n-9 in Dakar, whereas Fe and Zn were negatively correlated with 16:1n-7 in Casamance.

Tracer	As	Cd	Co	Cu	Fe	Li	Mn	Ni	Pb	Sn	U	Zn
$\delta^{15}\text{N}$					0.552 **	-0.678 ***						
14:0											0.507 **	
15:0	0.520 **	0.544 **			0.663 ***		0.604 ***	0.611 ***	0.684 ***			0.745 ***
ant17:0							0.614 ***		0.669 ***			0.776 ***
iso17:0									0.686 ***			0.633 ***
17:0	0.512 **											
18:0												0.510 **
17:1n-8						-0.522 **						
18:1n-9				-0.551 **			-0.569 **					-0.594 **
18:1n-11								0.533 **				
16:3n-6									0.567 **			
18:2n-4						-0.578 **			0.524 **	0.518 **		
20:4n-6					0.580 **		0.561 **		0.638 ***			0.656 ***
22:4n-6	0.609 ***								0.559 **			
22:5n-6			0.529 **		0.529 **				0.783 ***			
20:5n-3				0.637 ***								
20:4n-3						0.564 **	0.596 **					

**Table 12 Correlations (40) between trace metals and tracers in Dakar. Only correlations with a coefficient > 0.5 are shown. \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001.**



Tracer	Cd	Co	Cu	Fe	Li	Mn	Ni	Pb	U	Zn
$\delta^{13}\text{C}$					-0.530 ***			0.574 **		
17:0	0.613 ***									0.531 **
18:0				0.594 **						
16:1n-7				-0.539 **						-0.519 **
16:2n-4					0.584 **					
16:4n-1		0.507 **								
18:3n-3					0.593 **					
20:1n-9		0.554 **								
20:4n-3		0.659 ***			0.725 ***					
20:4n-6			0.693 ***					0.535 **		0.557 **
21:5n-3		0.594 **			0.667 ***					
22:4n-6				0.554 **					0.513 **	
22:5n-3	0.621 ***	0.800 ***			0.640 ***		0.502 **		0.533 **	
22:6n-3			0.503 **			0.507 **				0.598 **

**Table 13 Correlations (28) between trace metals and tracers in Casamance. Only correlations with a coefficient > 0.5 are shown. \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001.**

## Discussion

### Stable isotope analysis

In marine ecosystems, stable isotopes are commonly used to infer trophic levels through  $\delta^{15}\text{N}$  values and offshore *versus* inshore, or pelagic *versus* benthic inputs through  $\delta^{13}\text{C}$  values. Moreover, the position of individuals in bivariate isotope space (the isotopic niche) is considered a convenient proxy for the trophic niche (Layman et al., 2012). Because carbon and nitrogen half-lives are higher in muscle than in liver tissues (Buchheister and Latour, 2010), and trace metal elements can take several months to accumulate (Berntssen et al., 2001), muscle stable isotopes signature as been widely used in ecotoxicological studies (Chouvelon et al., 2012b; Domi et al., 2005).

Individual fish from Dakar occupied three distinct trophic niches. The first one (group one) was characterised by low  $\delta^{15}\text{N}$ , which reflected a low trophic position within the fish community and a low  $\delta^{13}\text{C}$  that indicated pelagic/offshore dietary habits. Trophic level is known to change during ontogeny, even for small pelagic fish like *S. japonicus* (Costalago et

al., 2012) which alone constitute the first group. The low trophic level of this group can thus also be explained by the small size of the fish sampled for this species (Table 1).

The second group, which showed similar  $\delta^{13}\text{C}$  but higher  $\delta^{15}\text{N}$ , may also feed on pelagic prey but at an intermediate trophic level. For *B. boops* individuals, which all belonged to this group, this is in accordance with the relatively low trophic level reported for this species (TL = 3; Table 10), whereas for *T. trecae*, the reported trophic level is similar to that of species belonging to the third group (TL = 3.5; Table 10). It can also be explained by the fact that fish sampled here were immature and thus might feed at a lower trophic level than adults.

Finally, the third group occupied a niche characterised by higher  $\delta^{15}\text{N}$  but lower  $\delta^{13}\text{C}$  than the two other groups. The fish in this group may feed on more benthic/coastal prey and at a higher trophic level than other groups. The three fish species constituting this group are known to share similar trophic level (close to 3.5; Table 10) which supports the relevance of their stable isotopes clustering.

In the fish community of Casamance, three main isotopic niches were also observed. Group one contained fish with both low  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$ , which suggested that the fish were feeding on pelagic prey of lower trophic levels. In contrast, other groups displayed higher  $\delta^{13}\text{C}$ , which showed a more benthic/coastal origin of the prey.

Among them, group two was also characterised by higher  $\delta^{15}\text{N}$  signatures than the two other groups, which suggested a higher trophic level. It contained various species, mostly with reported high trophic levels like the Guachanche barracuda *Sphyræna guachancho* (4.4; Table 10).

Finally, group three shared the  $\delta^{15}\text{N}$  signature of group one, which is in accordance with the reported trophic levels of *C. chrysurus* which mostly composed group one (3.5; Table 10) and *G. decadactylus* (3.6; Table 10) which mostly belonged to group three. On the other hand, the bigeye grunt *Brachydeuterus auritus* which also showed similar  $\delta^{15}\text{N}$  was previously known to have a lower trophic level than these species (3; Table 10).

### **Fatty acid analysis**

Fish sampled offshore of Dakar were structured in three major groups based on their FA composition. The first group only included *S. japonicus*, which also differed from other species based on its composition of stable isotopes. Except for this species, FA groups poorly

fitted SI groups, which strengthened the need to use different tools to characterise dietary habits.

This species was characterised by its high amount of n-3 PUFAs ( $\Sigma$  n-3, Table 11). Because 20:5n-3 (eicosapentaenoic acid, EPA) is commonly considered a marker of diatoms (e.g., Meziane and Tsuchiya, 2000; Kharlamenko et al., 2001; Alfaro et al., 2006) and 22:6n-3 (docosahexaenoic acid, DHA) is a marker of dinoflagellates, the ratio of these two FAs has been used to determine the predominant taxa in phytoplankton (Parrish et al., 2000). The EPA/DHA ratio in this first group was higher than one, which suggests that *S. japonicus* relies on higher proportions of a diatoms-based food web (Alfaro et al., 2006). The first group was also characterised by a higher content of 22:1n-11 than group three. This FA is known to be synthesised in high proportions by copepods and has been commonly used to evaluate the reliance of fish species on copepod-based pelagic food webs (Stowasser et al., 2009, 2012). Therefore, the FA composition of this group fits with the previously described diet of immature chub mackerels, which have been reported to rely on copepods and euphausiids in the North-West African shelf (Castro, 1993). Considering these observations, *S. japonicus* from the region of Dakar may therefore rely on herbivorous zooplankton feeding on diatoms, which is in accordance with the low  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  observed for this species.

The second group contained individuals from *B. boops*, *C. rhonchus* and *T. trecae* and was characterised by its high content of 16:0, which is a ubiquitous FA that most organisms are able to synthesise *de novo*. Even if its abundance varies among taxa, it is difficult to attribute its presence to a specific type of prey. This group also showed high amounts of 18:1n-9, a major FA in most marine animals, which are able to biosynthesise it *de novo* by chain elongation from 18:0 (Kelly and Scheibling 2012). In benthic environments, this FA has been identified in various dietary sources, such as brown algae, mangrove detritus or animal material (Bachok et al., 2003; Alfaro et al., 2006; Jaschinski et al., 2011). In pelagic ecosystems, it has been used as a marker of carnivory (Pethybridge et al., 2014). However, this FA can also be abundant in phytoplankton species (Dalsgaard et al., 2003; Escribano and Pérez, 2010), and its presence in higher trophic levels may depend more on its abundance on basic components of the food web than on the trophic level of the consumer. At high and temperate latitudes, the seasonal food supply induces the storage of lipid reserves by zooplankton (Kattner and Hagen, 2009). Zooplankton from these regions are known to

display high proportions of 18:1n-9 in these reserves (Lee et al., 2006). In tropical and subtropical waters, copepods from the oligotrophic epipelagic environment are characterised by continuous feeding and generally do not accumulate lipids in significant amounts in the upper 250 m of the water. In contrast, in deeper environments, copepods are exposed to lower prey densities and feed mainly through episodic sedimentation events, which results in higher energy storage than for epipelagic copepods including higher 18:1n-9 levels (Teuber et al., 2014). Upwelling regions are characterised by periodic high productivity events, which are comparable to the seasonal food input at temperate and high latitudes and may thus result in similar lipid storage strategies. It has been reported that copepods feeding on pico- and nanoplankton also displayed higher 18:1n-9 levels than those feeding on microplankton, where this FA can be absent (Escribano and Pérez, 2010). Here, 18:1n-9 was strongly negatively correlated with EPA (diatoms marker) and DHA (dinoflagellates marker) (Supplementary material), which were the least abundant in group two. As diatoms and dinoflagellates are the major components of microplankton (Anabalón et al. 2014), this suggests that this group relies on small-sized fractions of phytoplankton. Moreover, this group was also characterised by a high content of 16:1n-7, which is generally considered a diatoms marker (e.g., Richoux and Froneman 2008) but has also been reported as abundant in bacteria (Kharlamenko et al. 2001) and is abundant in marine sediments (Perry et al. 1979). Here, the fact that 16:1n-7 is negatively correlated with the dinoflagellates marker 22:6n-3 suggests a benthic origin.

Thus, the FA compositions for these individuals were in accordance with the reported diets of the species included in this group. Indeed, for the class size sampled here (see Table 10), *T. trecae* is known to feed on planktonic crustaceans, and *C. rhonchus* presents a diet composed of small planktivorous fish and planktonic and benthic crustaceans (Boëly et al., 1973; Sley et al., 2008), whereas *B. boops* shows an omnivorous diet composed of fish, benthic crustaceans and zooplanktonic prey (Derbal and Hichem Kara, 2008). In group two, the abundance of 18:1n-9 may reflect the consumption of pelagic prey, zooplankton or small fish, whereas the 16:1n-7 signature may result from the ingestion of benthic crustaceans.

The third group gathered three species, *B. boops*, *D. Bellottii*, *P. Prayensis*, and was discriminated by 18:0, also a ubiquitous FA synthesised through elongation of 16:0. This group was also characterised by 18:1n-7, which is commonly used to assess the bacterial

contribution in the marine food web (Meziane and Tsuchiya, 2000; Kharlamenko et al., 2001; Alfaro et al., 2006), and 20:4n-6. The latter has been reported to be abundant in brown and red algae (Kelly and Scheibling, 2012) but can be found in high proportions in marine invertebrates from sites devoid of macroalgae, which is the case for most of the Senegal coastline. Therefore, the authors hypothesised that this FA may result from feeding upon drift algae, phytodetritus or microbial mats (Cook et al., 2000). Many other primary producers are also able to synthesise this FA, such as diatoms (Dunstan, et al. 1993), fungi and protozoa (Kim et al., 1998; Kharlamenko et al., 2001). It has also been shown in controlled feeding and *in situ* studies that this FA can be selectively retained or biosynthesised *de novo* by bivalves and crustaceans (Soudant et al., 1996; Budge et al., 2001; Kelly et al., 2009). Finally, it has been used to identify the consumption of benthic prey in marine fish (Stowasser et al., 2009). In the present study, it was positively correlated with 22:4n-6 alongside the 22:5n-6 (Supplementary material), which can all be synthesised from 20:4n-6. Because this group is also characterised by high bacterial marker content, such as 15:0, it is likely that high amounts of (n-6) PUFAs in this group come from the assimilation of phytodetritus and the microphytobenthos. Again, this is in accordance with the described ecology of the species included in this group, which is dominated by two benthic fish. *D. bellottii* shows an omnivorous diet composed of algae, bivalves and crustaceans (Horta et al., 2004), whereas *P. prayensis* feeds mainly on benthic invertebrates (Caverivière, 1993).

In the fish sampled in Casamance, the first group was mainly discriminated from others by its high content of n-3 PUFAs (Fig. 3B). As observed in group one from Dakar, this group may also rely on a pelagic food web. However, an EPA/DHA ratio lower than one indicates that dinoflagellates were more important than for fish from Dakar. This group is dominated by *C. chrysurus*, which is known to be a pelagic particulate feeder (Faye et al., 2011), and *C. rhonchus*. The latter is an opportunistic piscivorous species for the size class sampled in Casamance (see Table 10) and feeds at almost 70% on planktivorous fish, mainly on anchovies *Engraulis encrasicolus* and to a lesser extent on clupeids such as the round sardinella *Sardinella aurita* (Boëly et al., 1973; Sley et al., 2008). Anchovies are known to contain high levels of DHA (Pethybridge et al., 2014), which seems to confirm this species as the dominant prey for *C. rhonchus*.

Two individuals of the barracuda *S. guachancho* were also found in this group. This piscivorous species feeds mainly on small pelagic fish such as *Sardinella spp.*, *T. trecae* and *C. chrysurus* for the size class of individuals sampled (see Table 10; Akadje et al., 2013). Hence, it is not surprising to find this species alongside *C. chrysurus*, which confirms that the FA composition of a predator reflects that of its prey. Therefore, group one mostly contains phytoplankton-feeding species and their direct predators, which share a similar FA composition.

The second group in Casamance was discriminated from others by 18:1n-9 and from group one by 16:1n-7, which is similar to what was observed for fish from Dakar. This group was dominated by *B. auritus*, which is known to feed on a variety of sources, including copepods and the African moonfish *Selene dorsalis*, which feeds on pelagic fish and crustaceans (Caverivière, 1993; Diouf, 1996). It also included three barracudas that may feed on different species of forage fish than their conspecifics belonging to group one. Because *C. chrysurus* and *Sardinella* species are characterised by high levels of n-3 PUFAs (Njinkoué et al., 2002), it can be hypothesised that barracudas from group two fed on *T. trecae* instead, which showed a high level of 18:1n-9 in Dakar.

In summary, group two gathers secondary and tertiary consumers and belongs to a pelagic food web based on phytoplankton phyla other than diatoms and dinoflagellates.

*G. decadactylus* was the only species classified in the third group for fish sampled in Casamance. This species was characterised by its content of the benthic marker 16:1n-7 and 18:1n-7. The latter has been linked to diatoms (Dalsgaard et al., 2003) and was thus used as an herbivory marker for copepods in the Benguela upwelling system (Schukat et al., 2014). It has also been found alongside 16:1n-7 in high amounts in the surface sediments of the Humbolt upwelling ecosystem (Gutiérrez et al., 2012) and is commonly used to assess the bacterial contribution in marine food webs (Meziane and Tsuchiya, 2000; Kharlamenko et al., 2001; Alfaro et al., 2006). Moreover, in this study, this FA was positively correlated to iso17:0 (Supplementary material), which is known to be predominantly synthesised by bacteria (Volkman et al., 1980) and used as a bacterial marker in sediments (Rajendran et al., 1993, 1992). This suggests that here, 18:1n-7 must be more associated with the benthic ecosystem than with the pelagic one. This is in accordance with the described ecology of *G.*

*decadactylus*, which lives over sandy and muddy bottoms and feeds mainly on benthic crustaceans (Caverivière, 1993).

### **Metal concentration differences between trophic groups**

In the present study, the trophic groups inferred by the analysis of dual stable isotopes poorly explained the variability in terms of bioaccumulation. In Dakar, the association of coastal/benthic food intake with a higher trophic level only led to a largest accumulation of Pb, whereas in Casamance, only Li was dominant in fish showing offshore/pelagic habits combined with low trophic levels. Some studies have successfully associated the contents of some metals like mercury (Hg) and Cd with the isotopic niche of marine fish species (Das et al., 2000; Domi et al., 2005). However, most of the trace metal elements are in general not correlated to  $\delta^{15}\text{N}$  nor  $\delta^{13}\text{C}$  in fish communities (Goutte et al., 2015; Ofukany et al., 2014). The distribution of the elements analysed here could not be only attributed to the feeding habitat or trophic level, which implied no biomagnification (*i.e.* increase with  $\delta^{15}\text{N}$ ) like it is well documented for Hg (McMeans et al., 2010; Pethybridge et al., 2012). Hence, a more precise determination of the food sources was necessary to understand the pathways of metal accumulation.

To our knowledge, there is no published study using fatty acids to infer the dietary origin of metal accumulation in a marine fish community. In this study, we attempted to demonstrate how bioaccumulation of several trace metal elements relates to the trophic preferences of the fish using the FA composition.

In Dakar, where anthropogenic inputs occurred, the consumption of benthic prey led to a higher contamination of Cd, Ni, Pb, Fe, Co, Zn, As, and Sn (Fig. 4A). This was highlighted by the positive correlation found between these elements and at least one FA from a benthic origin (Table 3). These FAs included bacterial markers, such as iso17:0, ant17:0 and 15:0 (Volkman et al., 1980), which are characteristic of sediment communities (Rajendran et al., 1993, 1992) and were more abundant in group three ( $\Sigma$  BAFA). This benthic FA pool also contained n-6 PUFAs from phytodetritus or the microphytobenthos, which were, like BAFAs, more abundant in group three ( $\Sigma$  n-6). Within the pelagic ecosystem, the microphytoplankton-based food web seemed to be a major pathway for the transfer of Mn,

Pb and Zn to fish as revealed by the negative correlation between Mn and Zn and the nano- and picoplankton marker 18:1n-9 (Table 3), which may be less impacted by these elements. Indeed, taxonomic differences in the plankton metal concentration can exist as shown between diatoms, flagellates and picophytoplankton (Twining and Baines, 2013; Twining et al., 2015). These differences can also vary between ocean basins and the elements considered. In this fish community, pelagic and benthic predators had different pathways for metal accumulation.

Conversely, in the community from Casamance, feeding on pelagic prey seemed to induce a higher accumulation of Fe and Zn (Fig. 4B) as indicated by the negative correlation between these elements and the benthic marker 16:1n-7 characterising group three and the positive correlation between Zn and DHA, a dinoflagellates marker that was found in higher proportions in groups one and two. Furthermore, fish belonging to the microphytoplankton-based food web (group one) were more exposed to Co, Cu and Sn than benthic feeders (group three). This is suggested by the correlation found between Co and Cu and n-3 PUFAs, which were dominant in group one. Indeed, Cu was positively correlated with DHA and Co with 22:5n-3, which is formed *de novo* from EPA. Co was also correlated with 20:4n-3, which can be used to characterise either fungi, protozoa or algae (Kharlamenko et al., 2001). In this case, it was present alongside the dinoflagellates marker DHA, suggesting a pelagic origin. Finally, diatom-feeding fish or their predators from group one accumulated more Li than other species. Contamination of this group by Li can also be linked to planktonic n-3 PUFAs (20:4n-3 and 22:5n-3) and to 18:3n-3. The production of 18:3n-3 from 18:1n-9 is only realised by primary producers and requires delta 12 and delta 15 desaturase enzymes, respectively (Dalsgaard et al., 2003). Thus, primary producers (*i.e.* phytoplankton) seem to be particularly involved in Li transfer to the fish community.

Although not responsible for the differences among groups, some correlations between individual trophic markers and trace metals can give new insights into the determination of their origin near the coastline of Senegal (Tables 4 and 5).

In the Dakar fish community, Fe was positively correlated with  $\delta^{15}\text{N}$ , which suggests an increase with trophic level. This result is in accordance with the predominance of this element in the benthic predators group inferred by FAs. U was likewise correlated with 14:0, which is the dominant FA in marine cyanobacteria (Merritt et al., 1991; Carpenter et al.,



1997) and suggests the benthic origin of this metal. In contrast, Cu and Li seemed to result from the consumption of pelagic organisms. Indeed, Cu was positively correlated with the diatoms marker EPA, and negatively with the nano- and picoplankton marker 18:1n-9, revealing dominance in the microphytoplankton. Moreover, Li was positively correlated with the planktonic 20:4n-3 and negatively with  $\delta^{15}\text{N}$ , which reveals a stronger presence in the lower trophic level species that feed on planktonic prey. It was also negatively correlated with 17:1n-8 and 18:2n-4, two FAs synthesised in large amounts by bacteria (Pond et al., 1997; Dalsgaard et al., 2003). Along with the results of the Li distribution in Casamance, it can be concluded that this element may be predominant in the pelagic environment.

In Casamance, Pb was associated with the coastal/benthic isotope signature inferred by  $\delta^{13}\text{C}$  and 20:4n-6, which was likely the result of phytodetritus consumption. This corroborates observations in Dakar, which indicate that Pb may be derived from coastal anthropogenic sources (Diop et al., 2015). Cd and U were found to be associated with both the planktonic FA 22:5n-3 and a bottom linked FA: the bacterial FA 17:0 for Cd and the phytodetritus marker 22:4n-6 for U. Conversely, for observations in Dakar where these two elements had only a benthic origin, they seemed to result from a larger variety of sources in this case. Finally, Mn and Ni were only linked to n-3 PUFAs, which suggests a pelagic origin.

### **Differences in accumulation patterns between communities**

Physiological characteristics, such as subcellular differences in handling metals (Eyckmans et al., 2012), can lead to differences in metal accumulation between species. However, even if only one species, *C. rhonchus*, was present in both of the stations sampled, general patterns can be drawn from the two fish communities.

In Dakar, among the 13 elements analysed, only two metals (Cu and Li) were only associated with planktonic markers, whereas eight of them (As, Cd, Co, Fe, Ni, Pb, Sn and Zn) were exclusively related to bacterial or phytodetritus/microphytobenthos markers (Table 6). As a result, the two species that generally accumulated more metals were the two benthic predators *D. bellottii* and *P. prayensis*. Concerning Cd, Ni and Pb, these results are in accordance with previous studies regarding the metallic contamination of sediments from the Dakar area and where high levels of these metals have been reported (Diop et al., 2012;

Diagne et al., 2013; Diop et al., 2015). Furthermore, it is in accordance with the theory concerning the distribution of metals between the particulate and dissolved fraction. Indeed, Co and Pb are scavenged in greater amounts by the solid phase in the water column from the Dakar coast, which explains the fact that these elements sink to the sediments (Diop et al., 2014). Surprisingly, these authors also found high amounts of Cr, whereas in this study, no correlation was established between this element and any marker. Even if extremely high concentrations have been reported in mussels from the harbour of Dakar (up to 298 ppm dry weight, Diagne et al., 2013), Cr showed the lowest affinity to the bioavailable fraction in sediments from this area among the other metals (Diop et al., 2015). The authors concluded that Cr cannot be remobilised into the aquatic environment under normal biogeochemical conditions, which could explain the low Cr levels observed in fish. Likewise, the sediments presented an elevated contamination of Cu, whereas in the present study, it was associated with the pelagic environment. Finally, only Mn was found to correlate with the markers characteristic of both the pelagic and the benthic environment.

Location	Metal	Origin	Tracer
Dakar	As	Benthos	15:0, 17:0, 20:4n-6
	Cd	Benthos	15:0
	Co	Benthos	22:5n-6
	Fe	Benthos	15:0, 20:4n-6, 22:5n-6
	Ni	Benthos	15:0
	Pb	Benthos	15:0, ant17:0, iso17:0, 20:4n-6, 22:4n-6, 22:5n-6
	Sn	Benthos	$\delta^{13}\text{C}$
	U	Benthos	14:0
	Zn	Benthos	15:0, ant17:0, iso17:0, 20:4n-6
	Mn	Benthos/Pelagos	15:0, ant17:0, 20:4n-6/20:4n-3
	Cu	Pelagos	20:5n-3
	Li	Pelagos	20:4n-3
Casamance	Cr	undefined	
	Fe	Benthos	22:4n-6
	Pb	Benthos	$\delta^{13}\text{C}$ , 20:4n-6
	Cd	Benthos/Pelagos	17:0/22:5n-3
	Cu	Benthos/Pelagos	20:4n-6/22:5n-3
	U	Benthos/Pelagos	22:4n-6/22:5n-3
	Zn	Benthos/Pelagos	17:0, 20:4n-6/22:6n-3
	Co	Pelagos	20:1n-9, 20:4n-3, 21:5n-3, 22:5n-3
	Li	Pelagos	18:3n-3, 20:4n-3, 21:5n-3, 22:5n-3
	Mn	Pelagos	22:6n-3
	Ni	Pelagos	22:5n-3
	As	undefined	
Cr	undefined		
Sn	undefined		

Table 14 Dietary origin of the metal elements inferred by tracers (SI and FA) in the two locations.

Because the Dakar area is exposed to urban and industrial rejects (Diop et al., 2012, 2014; Diop et al., 2015), the contamination may occur near the coast as shown for Pb with the stable isotope analysis (Fig. 4A). Thus, the trace metal elements may be rapidly trapped in the sediments, leading to a high contamination of benthic organisms in this region. For example, the mussel, *Mytilus galloprovincialis*, from Dakar is known to be highly contaminated with Cd (up to  $8.5 \pm 2.8$  ppm dw) and Pb (up to  $380 \pm 70.5$  ppm dw) (Diagne et al., 2013), and the other mussel species, *Perna perna*, also showed a greater amount of Cd (up to  $7.55 \pm 1.65$  ppm dw) than in Morocco and Mauritania (Sidoumou et al., 2006; Diop et al., 2016). Finally, the two sand-living species, *Cardita ajar* and *Dosinia isocardia*, also presented very high levels of Cd ( $13.77 \pm 0.80$  and  $4.18 \pm 0.93$  respectively) (Sidoumou et al., 2006). Here, the sediment compartment seemed to be the major source for the transfer of metals up to the fish community.

Interestingly, in the Casamance region, metal concentration seems to be less dictated by the fish relationship with the sediments. Indeed, only Pb was exclusively related to microphytobenthos, whereas the other elements (Co, Li, Mn and Ni) were only associated with planktonic markers or both benthic and pelagic markers (Cd, Cu, Fe, U, and Zn) (Table 6). Accordingly, the species with the lowest accumulation levels was in general the benthic fish *G. decadactylus*. The occurrence of metals is not likely to be the result of local anthropogenic inputs because this region is not subjected to industrial activities or heavy urban development. However, it may occur through fish migrations from another contaminated areas or the transport of elements by the hydrodynamic process. The Senegalese coast is subjected to wind-driven upwelling, which occurs mainly in winter and is stronger from February to April. It induces a coastal jet arising from the geostrophic adjustment of the surface density gradient between the cold upwelled coastal waters and the warmer open ocean waters (Allen, 1973). This upwelling jet is confined nearshore and flows southward alongside the coast of Senegal (Fig. 1) (Auger et al., 2015). Furthermore, recent studies have shown that the coastal waters of southern Senegal come from the upwelling area of Dakar Bay, around 200 km northernmost, through advection processes (Ndoye, 2016). Because the fish were collected during the active upwelling season when the coastal current is the strongest, it strengthens the hypothesis of a transport of the metals from the Dakar area subjected to industrial effluents of this region.

Finally, this study suggests that microphytoplankton (*i.e.*, diatoms and dinoflagellates) were a more important source of accumulation than smaller size fraction species. Whereas nanoplankton are dominant in the phytoplankton community of the Dakar area, microplankton are the almost exclusive component in Casamance (Donval *personal communication*). As physical and biological factors seem to converge to induce a strong accumulation of trace metal elements in marine pelagic organisms in Casamance, further investigations are required to evaluate the impact of northern anthropogenic rejects in this region.

This case study of the coastal environment from Senegal showed that anthropogenic activities seemed to drive the input pathways of trace metal elements in the marine food webs. It also highlights the need to consider the trophic relationships to understand the accumulation patterns of the marine fish communities.

## **Conclusion**

This study demonstrated the implication of trophic ecology in the accumulation of several trace metal elements in fish communities. Stable isotopes (SIs) and fatty acids (FAs) were both relevant tools to discriminate trophic groups within the fish community, but FAs proved to be more discriminant to link metal contamination in fish with their trophic ecology. Because most previous studies trying to investigate metallic accumulation in the marine biota in relation to their trophic ecology used stable isotope analysis, we suggest that extending fatty acid analysis to heavy metal bioaccumulation studies would provide new perspectives.

In the region subjected to high anthropogenic metallic inputs, local rejects led to a higher accumulation in fish belonging to the benthic environment. In contrast, in the unaffected region, bioaccumulation was more associated with the pelagic ecosystem, where the metallic transfer to fish depended on the phytoplankton phylum on which the food web was based. This study suggests that microphytoplankton (*i.e.*, diatoms and dinoflagellates) were a more important source of accumulation than nano- and picoplankton species.

In the present study, bioaccumulation was clearly dependent on the trophic preferences of fish, as inferred through SI signature and FA composition, for several trace metal elements.

Moreover, fatty acids revealed many relationships between the dietary regimes and metal accumulation that were not visible with stable isotopes.

### **Acknowledgements**

The authors thank greatly Sébastien Hervé for the design of the Fig. 1 and the graphical abstract, and Jean Raffray for the identification and the dissection of the fish. Samples used in this study were collected during a scientific cruise of the AWA project in West Africa. This article benefited from the comments of two anonymous reviewers. This work was financially supported by the French National Research Agency project ANR-11-CEPL-0005 EPURE.

# Chapitre 4

L'habitat détermine l'accumulation du mercure par les poissons marins malgré une forte variabilité intraspécifique

***Gaël Le Croizier, Gauthier Schaal, David Point, François Le Loc'h, Eric Machu, Massal Fall, Jean-Marie Munaron, Pierre Walter, Raymond Laë, Luis Tito De Morais.***

***Soumis à Environmental Science & Technology.***

## 1. RESUME

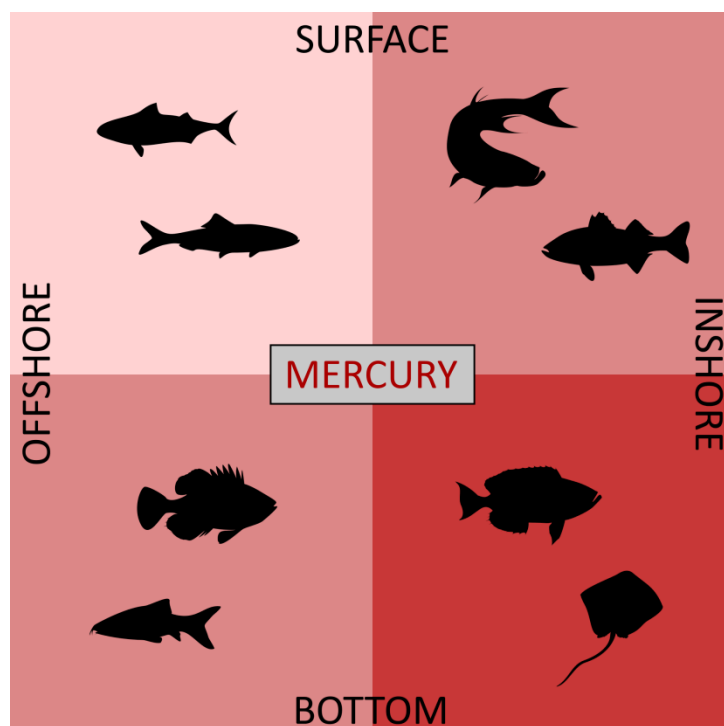
---

Les zones côtières se trouvant à l'interface entre le continent, l'atmosphère et l'océan, le cycle des éléments métalliques au sein de ces écosystèmes va d'abord dépendre des apports issus de ces trois compartiments. Ensuite, des processus physicochimiques internes tels que l'hydrodynamisme et la spéciation des métaux vont participer à les rendre disponibles auprès des organismes marins qui les assimilent. Dans le cas du mercure, les sources principales pour les écosystèmes côtiers sont représentées par les upwellings, les dépôts atmosphériques et les apports en eau d'origine terrestre (Cossa et al., 1996). Une fois dans l'eau de mer, le mercure peut être méthylé par des bactéries sulfato-réductrices, avant d'être assimilé par le phytoplancton et bioamplifié le long de la chaîne trophique (Fitzgerald et al., 2007). Cette particularité conduit à de fortes valeurs d'accumulation pour les prédateurs de haut niveau trophique tels que les requins (McKinney et al., 2016). D'autre part, l'activité bactérienne augmentant la biodisponibilité du mercure dépend des milieux, de même que certains mécanismes réduisant au contraire son affinité biologique, tels que la photodégradation (Lehnherr et al., 2011). L'assimilation de cet élément toxique par les producteurs primaires et son transfert subséquent jusqu'aux poissons varie ainsi en fonction de l'habitat considéré.

Dans ce contexte, l'objectif de ce quatrième axe est d'apprécier l'impact de l'habitat sur l'accumulation du mercure par les poissons marins du courant des Canaries. Le littoral Sénégalais a été choisi comme cas d'étude car il présente une diversité de sources de mercure potentielles, comme les rejets anthropiques, le courant d'upwelling côtier et les eaux de plusieurs grands estuaires. Un large panel d'espèces échantillonnées à plusieurs sites a été classé en différents groupes en fonction de leur habitats décrits dans la littérature (Fishbase ; Froese et Pauly, 2017). Ensuite, le niveau trophique des individus a été déterminé par l'analyse des rapports isotopiques de l'azote ( $\delta^{15}\text{N}$ ). Leurs préférences en termes de zone d'alimentation ont quant à elles été obtenues par l'analyse des isotopes du carbone ( $\delta^{13}\text{C}$ ). Les concentrations en mercure ont été mesurées dans le muscle des poissons, et mises en relation avec les caractéristiques spécifiques et individuelles concernant l'occupation de l'habitat. Enfin, les valeurs de mercure ont été comparées avec les normes européennes et

internationales, afin de juger du risque sanitaire engendré par la consommation de poissons marins de cette région.

Ces analyses ont premièrement révélé des différences entre sites au regard des sources de nutriments et des concentrations en mercure, suggérant l'influence de différents apports tels que les résurgences d'upwelling et les eaux estuariennes. Ensuite, une accumulation de mercure plus forte chez les espèces aux affinités côtières et démersales a été observée, contrairement à celles aux préférences océaniques et pélagiques. A l'échelle individuelle, la bioamplification du mercure a été retrouvée pour les sites au sein desquelles une seule source d'azote était prédominante. Une corrélation a été établie entre niveau de mercure et origine principale du carbone, révélant encore une fois l'exposition métallique majoritaire des poissons exploitant des habitats côtiers et benthiques. A l'instar des régimes alimentaires, les poissons étudiés présentent une importante variabilité intraspécifique en termes d'occupation de l'habitat. Néanmoins, les schémas d'accumulation du mercure observés à l'échelle individuelle concordent avec ceux déterminés à partir des caractéristiques spécifiques. Finalement, les concentrations en mercure retrouvées dans le cas de cette étude sont en dessous des valeurs fixées par les différentes instances sanitaires, même si une consommation exagérée des certaines espèces aux caractéristiques côtières et démersales pourrait potentiellement engendrer des troubles liés à la toxicité du mercure.





## 2. ARTICLE N° 4

---

# FORAGING HABITAT DRIVES MERCURY ACCUMULATION IN MARINE FISH SPECIES DESPITE HIGH INTRASPECIFIC VARIABILITY

Gaël Le Croizier<sup>1</sup>, Gauthier Schaal<sup>1</sup>, David Point<sup>2</sup>, François Le Loc'h<sup>1</sup>, Eric Machu<sup>34</sup>, Massal Fall<sup>45</sup>, Jean-Marie Munaron<sup>1</sup>, Pierre Walter<sup>2</sup>, Raymond Laë<sup>1</sup>, Luis Tito De Morais<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/IFREMER, BP 70, 29280 Plouzané, France

<sup>2</sup>UMR Géosciences Environnement Toulouse (GET), Observatoire Midi Pyrénées (OMP), 14 avenue Edouard Belin, 31400 Toulouse, France

<sup>3</sup>Univ. Brest, CNRS, IRD, Ifremer, Laboratoire d'Océanographie Physique et Spatiale (LOPS), IUEM, 29280, Plouzané, France.

<sup>4</sup>Laboratoire de Physique de l'Atmosphère et de l'Océan *Siméon Fongang*, Université Cheikh Anta DIOP de Dakar, Ecole Supérieure Polytechnique, BP 5085 Dakar Fann, Sénégal

<sup>5</sup>Centre de Recherches Océanographiques de Dakar-Thiaroye (CRODT/ISRA), BP 2241, Dakar, Sénégal

## Abstract

Bioaccumulation of metal elements including mercury (Hg) can be highly variable in marine fish species. Metal concentration is influenced by various species-specific physiological and ecological traits including individual diet composition and foraging habitat. The impact of trophic ecology and habitat preference on Hg accumulation was assessed through total Hg concentration and stable isotopes ratios of carbon ( $\delta^{13}\text{C}$ ) and nitrogen ( $\delta^{15}\text{N}$ ) analyzes in the muscle of 137 fish belonging to 23 different species from the Senegalese coast (West Africa). Species-specific ecological traits were first investigated and results showed that vertical (*i.e.* water column distribution) and horizontal distribution (*i.e.* distance to the coast) led to differential Hg accumulation patterns between species. Coastal and demersal fish species were more contaminated than offshore and pelagic species. Individual characteristics then revealed an increase of Hg level in fish muscle alongside trophic level for some locations. Considering all individuals, the main carbon source was significantly correlated with Hg level revealing once more a higher accumulation for fish foraging in nearshore and benthic habitat. The large intraspecific variability observed in stable isotope signatures highlighted the need to conduct ecotoxicological studies at the individual level to ensure a thorough understanding of mechanisms driving metal accumulation in marine fish. Despite variability in individual behaviors, within-species patterns of Hg accumulation were in accordance with the results based on species-specific features. Finally, Hg amounts in fish muscle were discussed regarding human health impact. No individual exceeded the current maximum acceptable limit for seafood consumption set by both the European Union and the Food and Agriculture Organization of the United Nations. However, overconsumption of some coastal demersal species analysed here could be of sanitary concern regarding human exposition to Hg.

## Introduction

Mercury (Hg) is a toxic metal element originating in marine environments from both natural and anthropogenic processes, including geologic weathering, gold mining, combustion and industrial discharges (Streets et al., 2011). Coastal environments are particularly submitted to Hg exposure since they are located at the interface between three main Hg sources: atmosphere, rivers and ocean (Cossa et al., 1996). Once deposited in sea water, Hg can be methylated by sulfate-reducing bacteria (Fitzgerald et al., 2007), being easily taken up by phytoplankton and biomagnified along trophic chains. Biomagnification (*i.e.* Hg content increase with trophic level) is responsible for high Hg concentration in the tissues of top predators like tunas and sharks (McKinney et al., 2016). As trophic level is tightly correlated to nitrogen stable isotope ratios ( $\delta^{15}\text{N}$ ) (Post, 2002), this marker has been extensively used to explain Hg amounts in biota (Chouvelon et al., 2012b; Kiszka et al., 2015; McMeans et al., 2010; Pethybridge et al., 2012). Species with similar trophic level can however display different patterns of accumulation (Bank et al., 2007; Le Croizier et al., 2016b) and other factors have been linked to Hg concentrations such as fish size, foraging depth, geographic region or physicochemical parameters (Cossa et al., 2012). In particular, some studies focusing on Hg sources found differences in Hg concentrations between offshore and nearshore species or between pelagic and benthic species (Cresson et al., 2014; Sackett et al., 2015; Senn et al., 2010). Carbon stable isotope ratios ( $\delta^{13}\text{C}$ ) have commonly been used to discriminate offshore/pelagic from coastal/demersal habits in fish species, in order to investigate the role of foraging habitat in Hg bioaccumulation (Goutte et al., 2015). Some fish species can however present a wide range of prey and habitat use, which leads to a large intraspecific variability in terms of metal accumulation (Das et al., 2000; Le Croizier et al., 2016b). It seems therefore essential to conduct ecotoxicological studies at the individual level to better determine the drivers explaining Hg concentration in fish tissues. Finally, as Hg can cause serious neurological impairments among others pathology (Bosch et al., 2016) and fish consumption represents the major pathway for human exposition to Hg (Driscoll et al., 2013), it is of great interest to assess the fish ecological traits inducing a significant risk to human health.

The goals of the present study were first to investigate the role of geographical or species-specific characteristics (*i.e.* water column distribution and distance to the shore) on Hg bioaccumulation in fish communities from various sites along the Senegalese coast. Second, the link between trophic level and foraging habitat was estimated through the use of individual isotopic signatures, in order to assess whether Hg accumulation patterns at the species level were conserved despite the large intraspecific variability expected. Third, the potential health impacts associated to the consumption of fish in the area were discussed according to the tolerable Hg intake set up by the European Union and the Food and Agriculture Organization of the United Nations.

## **Materials and methods**

### **Sampling**

A total of 137 fish belonging to 23 different species were sampled at different locations along the Senegalese coast (West Africa): Saint-Louis, Grande-Côte, Dakar, Saloum and Casamance (from north to south) (Figure 26). Saint-Louis, Saloum and Casamance are located off estuaries, while Grande-Côte and Dakar are located along a sandy and rocky coast, respectively. Samples were collected during the AWA (Ecosystem Approach to the management of fisheries and the marine environment in West African waters) scientific cruise in March 2014 aboard the RV Thalassa. Fish were caught with a bottom trawl net, packed in plastic bags and frozen on board at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  before further analyses.

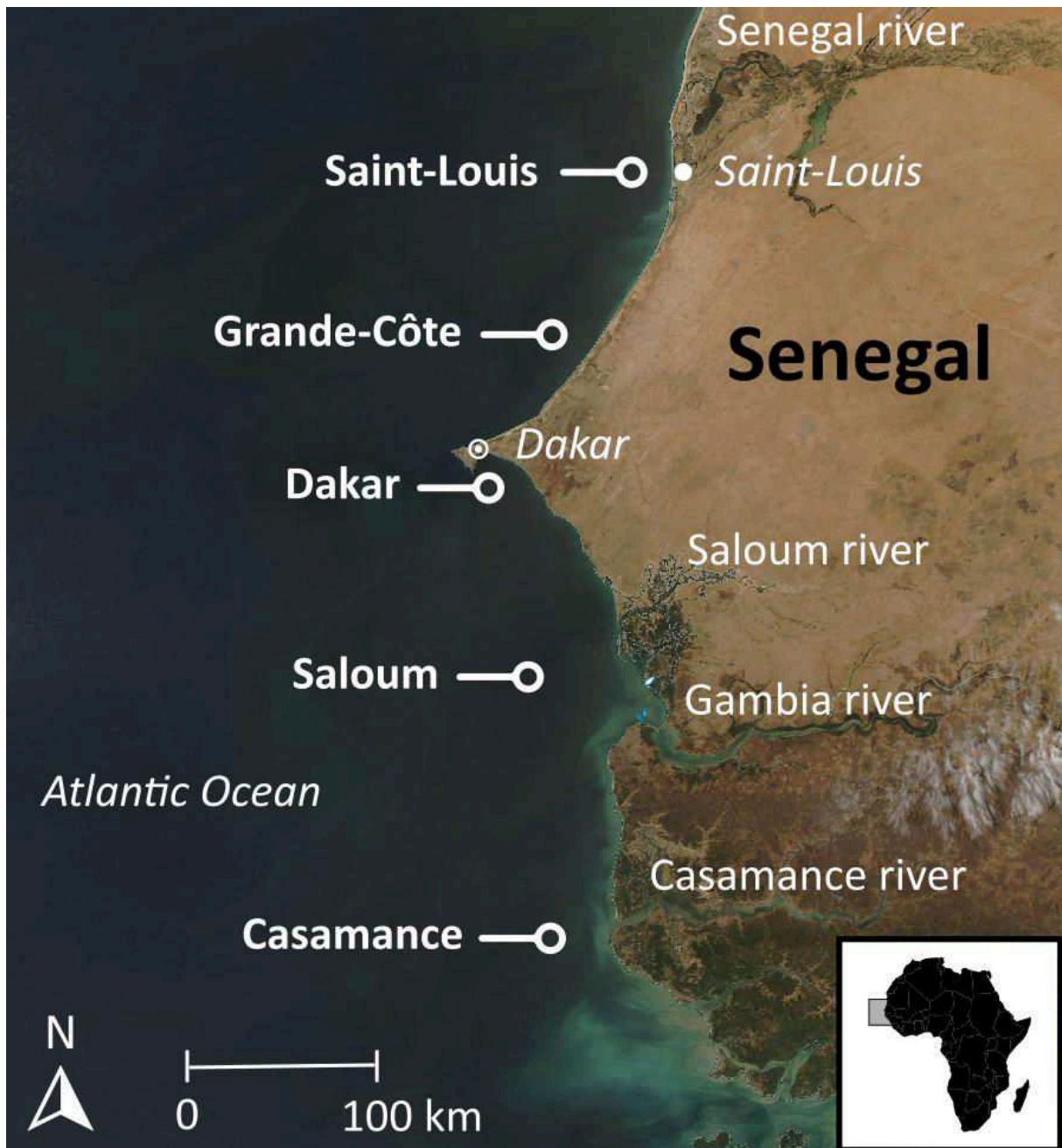


Figure 26 Sampling sites along the Senegalese coast (West Africa). Saint-Louis, Saloum and Casamance are estuarine sites, while Grande-Côte and Dakar are located along sandy rocky coasts.

### Chemical analyses

Once at the laboratory, fish were weighed (wet weight) and measured (total length) (Table 1). They were then dissected with ceramic tools to avoid metal contamination, and a piece

of dorsal muscle (a standardised cut on the dorsal muscle just behind the head) was collected. Muscle samples for the analysis of stable isotopes were freeze dried and ground into a fine and homogeneous powder. Approximately 350 µg of powder was then weighed in tin capsules for isotopic analysis. The samples were analysed by continuous flow on a Thermo Scientific Flash EA 2000 elemental analyser coupled to a Delta V Plus mass spectrometer at the Pôle de Spectrométrie Océan (Plouzané, France). The results are expressed in standard  $\delta$  notation based on international standards (Vienna Pee Dee Belemnite for  $\delta^{13}\text{C}$  and atmospheric nitrogen for  $\delta^{15}\text{N}$ ) following the equation  $\delta^{13}\text{C}$  or  $\delta^{15}\text{N} = [(R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}}) - 1] \times 10^3$  (in ‰), where R is  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  or  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ . Samples were not delipidated, because muscle generally contains a lower amount of lipids than other organs in fish (Njinkoué et al., 2002). However, since lipid content can impact  $\delta^{13}\text{C}$ , C/N ratios were measured. They exceeded 3.5 for a few samples and therefore a mathematical normalisation was applied, following the equation  $\delta^{13}\text{C}_{\text{normalized}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{untreated}} - 3.32 + 0.99 \cdot \text{C/N}$  (Post et al., 2007). International isotopic standards of known  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  were used: IAEA-600 Caffeine, IAEA-CH-6 Sucrose, IAEA-N-1 and IAEA-N-2 Ammonium Sulphate. A home standard (Thermo Acetanilide) was used for experimental precision (based on the standard deviation of the replicates of the internal standard) and indicated an analytical precision of  $\pm 0.11$  ‰ for  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\pm 0.07$  ‰ for  $\delta^{15}\text{N}$ .

Total Hg determination was carried out on an aliquot section of the dried muscle by combustion, gold trapping and atomic absorption spectrophotometry detection using a DMA80 analyzer (Milestone, USA). Mercury concentrations (ppm) in muscle samples are expressed on a dry weight basis ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw), and on a wet weight basis ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  ww) when needed with applying a moisture correction factor determined for each individual sample. The accuracy and the reproducibility of the method were established using two freeze-dried certified biological materials; a Tuna fish flesh homogenate reference material (IAEA 436, IRMM) and a Lobster Hepatopancreas reference material (TORT3, NRCC). The certified values for IAEA 436 ( $4.19 \pm 0.36$  ppm dw) were reproduced (measured:  $4.28 \pm 0.14$  ppm dw) within the confidence limits. The certified values for TORT3 436 ( $0.292 \pm 0.022$  ppm dw) were reproduced (measured:  $0.280 \pm 0.005$  ppm dw) within the confidence limits. Repeatability varied from 1.9 to 6.7 % depending on the concentration of the sample and its heterogeneity. The detection limit was 0.005 ppm dw.

Location	Species	TL	Shore	Habitat	Depth (m)	n	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Group	Hg (ppm dw)	Hg (ppm ww)
Saint Louis	<i>Brotula barbata</i>	3.8	Off	Demersal	33-37	4	11.14 ± 0.12	-16.99 ± 0.1	1	0.09 ± 0.01	0.02 ± 0
	<i>Merluccius senegalensis</i>	4.5	Off	Demersal	33-37	5	11.63 ± 0.59	-16.33 ± 0.36	1 and 2	0.22 ± 0.11	0.05 ± 0.03
	<i>Pterothrissus bellocci</i>	3	Off	Demersal	33-37	5	11.14 ± 0.13	-16.53 ± 0.08	1	0.08 ± 0.02	0.02 ± 0.01
	<i>Trichiurus lepturus</i>	4.5	Off	Benthopelagic	33-37	5	11.41 ± 0.31	-16.57 ± 0.21	1	0.06 ± 0.01	0.02 ± 0
	<i>Zeus faber</i>	4.5	Off	Benthopelagic	33-37	5	12.03 ± 0.51	-15.2 ± 0.55	1 and 2	0.18 ± 0.04	0.05 ± 0.01
Grande côte	<i>Trachurus trecae</i>	3.5	In	Benthopelagic	30-40	5	11.37 ± 0.16	-15.76 ± 0.42	1 and 2	0.09 ± 0.03	0.02 ± 0.01
Dakar	<i>Boops boops</i>	3	In	Demersal	66-81	5	10.12 ± 0.23	-15.77 ± 0.62	1 and 2	0.14 ± 0.1	0.03 ± 0.02
	<i>Caranx rhonchus</i>	3.6	In	Benthopelagic	66-81	4	11.53 ± 0.17	-15.42 ± 0.43	2	0.05 ± 0.01	0.01 ± 0
	<i>Diplodus bellottii</i>	3.5	In	Demersal	22-23	5	12.34 ± 0.35	-15.08 ± 0.42	2	0.34 ± 0.09	0.08 ± 0.02
	<i>Pseudupeneus prayensis</i>	3.2	In	Demersal	22-23	5	11.86 ± 0.36	-15.7 ± 0.44	1 and 2	0.21 ± 0.07	0.05 ± 0.02
	<i>Scomber japonicus</i>	3.4	Off	Pelagic	66-81	5	8.01 ± 0.28	-16.7 ± 0.34	1	0.04 ± 0.01	0.01 ± 0
	<i>Trachurus trecae</i>	3.5	In	Benthopelagic	22-23	5	10.92 ± 0.18	-16.42 ± 0.26	1	0.11 ± 0.02	0.03 ± 0
Saloum	<i>Chaetodon hoefleri</i>	3.5	In	Demersal	49-81	5	15.16 ± 1.36	-15.35 ± 0.71	1 and 2	0.14 ± 0.08	0.03 ± 0.02
	<i>Chelidonichthys gabonensis</i>	3.6	In	Demersal	49-81	5	10.88 ± 0.23	-16.96 ± 0.35	-	0.37 ± 0.14	0.09 ± 0.03
	<i>Dentex canariensis</i>	3.6	In	Demersal	49-81	5	12.32 ± 0.39	-16.54 ± 0.37	1	0.24 ± 0.14	0.06 ± 0.04
	<i>Dicologlossa hexophthalma</i>	3.4	In	Demersal	49-81	5	11.21 ± 0.14	-14.82 ± 0.14	2	0.42 ± 0.28	0.1 ± 0.07
	<i>Plectorhinchus mediterraneus</i>	3.5	In	Demersal	49-81	5	12.65 ± 0.22	-15.3 ± 0.09	2	0.47 ± 0.17	0.12 ± 0.04
	<i>Pseudupeneus prayensis</i>	3.2	In	Demersal	49-81	5	11.9 ± 0.3	-16.93 ± 0.55	1	0.43 ± 0.36	0.11 ± 0.09
	<i>Sphoeroides spengleri</i>	3.2	In	Demersal	49-81	4	11.34 ± 1.16	-15.57 ± 0.45	1 and 2	0.14 ± 0.06	0.03 ± 0.02
	<i>Trachurus trecae</i>	3.5	In	Benthopelagic	49-81	5	10.94 ± 0.22	-15.95 ± 0.6	1 and 2	0.09 ± 0.03	0.02 ± 0.01
	<i>Umbrina canariensis</i>	3.4	Off	Demersal	49-81	5	11.48 ± 0.27	-15.99 ± 0.21	1 and 2	0.09 ± 0.05	0.02 ± 0.01
Casamance	<i>Brachydeuterus auritus</i>	3	In	Benthopelagic	14-15	5	13.69 ± 0.3	-15.31 ± 0.15	2	0.35 ± 0.09	0.09 ± 0.02
	<i>Caranx rhonchus</i>	3.6	In	Benthopelagic	14-15	5	13.8 ± 0.83	-15.17 ± 0.27	2	0.58 ± 0.34	0.14 ± 0.08
	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	3.5	In	Pelagic	17-18	10	13.51 ± 0.45	-16.31 ± 0.61	1 and 2	0.1 ± 0.03	0.03 ± 0.01
	<i>Galeoides decadactylus</i>	3.6	In	Demersal	14-15	5	13.51 ± 0.2	-15.65 ± 0.23	1 and 2	0.08 ± 0	0.02 ± 0
	<i>Selene dorsalis</i>	4.1	In	Demersal	14-15	5	13.27 ± 0.87	-16.02 ± 0.48	1 and 2	0.23 ± 0.05	0.06 ± 0.01
	<i>Sphyraena quachancho</i>	4.4	In	Pelagic	14-15	5	13.78 ± 0.84	-15.77 ± 0.32	1 and 2	0.24 ± 0.14	0.06 ± 0.03

Table 15 Summary (mean ± standard deviation) of the different biological parameters measured on fish from different sampling sites. TL and habitat (Froese and Pauly, 2017) indicate respectively trophic level and water column distribution. “Shore” defines horizontal distribution of the species: “Off” includes bathydemersal and oceanodromous species while “In” includes coastal, brackish and estuarine species. “Group” is relative to k-means clustering of individuals based on  $\delta^{13}\text{C}$  values: “1” includes pelagic/offshore fish while “2” includes demersal/inshore individuals.

## Data analyses

All of the data submitted to statistical tests were first checked for normality (Shapiro-Wilks tests) and homogeneity of variances (Bartlett tests). When these conditions were met, raw data were used and one-way ANOVAs followed by Tukey's HSD tests were performed to test differences between locations and habitats. Otherwise, non-parametric analogues were used, *i.e.* Kruskal-Wallis tests followed by Conover-Iman multiple comparison tests with Bonferroni's adjustment. All of the statistical analyses were performed using the open source software R (version 3.3.2, R Core Team, 2016).

## Results and Discussion

### Spatial variations in stable isotope ratios and mercury

While no difference was found at the community level among sites for  $\delta^{13}\text{C}$  (Figure 27A), fish sampled off the Saloum estuary displayed higher  $\delta^{15}\text{N}$  than fish from Dakar, and fish sampled off the Casamance estuary showed higher  $\delta^{15}\text{N}$  than those from the four other locations (KW followed by Conover-Iman test;  $p < 0.001$ ) (Figure 27B). On the one hand, these observations can be due to the heterogeneous sampling in terms of species, possibly leading to differences in mean trophic level between locations. On the other hand, nitrogen inputs from watersheds to estuaries are known to stimulate microbial recycling of organic matter, leading to  $\delta^{15}\text{N}$  increases in coastal primary producers (McClelland and Valiela, 1998). However, the Saloum and Casamance are inverse estuaries and the exchange between the estuaries and the ocean results from circulation induced by tides. At this time of the year, shelf waters are renewed through the upwelling of subsurface waters which occurs just south of the Cape Verde peninsula in the Southern Senegal Upwelling Sector (SSUS) (Capet et al., 2016; Ndoye et al., 2017). Newly upwelled waters are mainly advected southward along the coast (Ndoye et al., 2017). It implies that new nutrients can be first uptaken and then recycled southward. Indeed, with currents of  $\sim 10\text{cm/s}$ , water upwelled around  $14^{\circ}40'\text{N}$  will take at least 20 days to reach the Casamance latitude. Though  $\delta^{15}\text{N}$  can vary with fish size leading to possible bias (Kiszka et al., 2015), trophic level derived from the literature did not follow  $\delta^{15}\text{N}$  spatial pattern (*i.e.* Saint-Louis = Casamance > Grande-Côte =



Dakar = Saloum; KW followed by Conover-Iman test,  $p < 0.001$ ), strengthening the assumption that microbial recycling either through freshwater inputs from Saloum and Casamance rivers or through the aging of upwelled enriched waters led to  $^{15}\text{N}$  enrichment which raised  $\delta^{15}\text{N}$  baselines.

Concerning Hg spatial variation, fish sampled off the Saloum estuary displayed higher Hg concentrations than those from Saint-Louis and Dakar (ANOVA followed by Tukey's HSD test;  $p < 0.01$ ) (Figure 27C). This difference could be due to differential sampling depth among the different sites. Methylmercury (MeHg) is an organic Hg species mainly produced by sulfate-reducing bacterial activity from inorganic Hg and generally represents more than 95 % of total mercury found in fish muscle (Bloom, 1992). As vertical distribution of MeHg exhibits increasing concentrations with depth, an increase in muscle Hg levels with depth has already been reported in various fish species (Choy et al., 2009; Cossa et al., 2012). As fish from Saloum were captured at a higher depth than those from other locations (*i.e.* between 49 and 81 m) (Table 1), this could potentially contribute to higher Hg levels found in fish from this site. Other possible explanations relate to hydrodynamic processes. First, Hg sources for coastal waters include inputs from upwellings, rivers, groundwaters, atmospheric deposition and waste water point sources (Cossa et al., 2017). The river-watershed largely contributes to Hg inputs to coastal waters (Balcom et al., 2015; Choe and Gill, 2003) and is estimated to be the highest total mercury source in ocean margins, mainly in association with organic particles (Cossa et al., 1996). The higher Hg contamination in fish from Saloum station may thus be the result of their feeding in the estuarine zone subjected to riverine inputs suggested by the high  $\delta^{15}\text{N}$  baseline. Moreover the Saloum site is located near the mouth of the Gambia River, which is impacted by the use of Hg for gold amalgamation in small artisanal mining (Niane et al., 2015). It is thus assumed that the Gambia River estuary can be a source of anthropogenic Hg for fish feeding in this coastal area, including those sampled at the Saloum site. Second, Hg bioavailability highly depends on water column stratification as MeHg production peaks at the thermohalocline where density gradient is maximum and allows organic matter accumulation and the associated bacterial activity (Cossa et al., 2012). In areas under riverine influence such as estuaries, freshwater inputs might generate a thermohalocline near the surface together with organic matter flocs which could enhance MeHg formation. This higher Hg bioavailability would thus be for part responsible of the higher Hg concentrations in fish from the Saloum region, which are supposed to feed in the

Saloum and Gambia river estuaries. Third, upwellings constitute a major Hg source from the ocean to the neritic zone. Indeed, MeHg is mainly formed near the shelf edge, where organic carbon degradation is intense. Upwelled waters from this depth can account for more than half of MeHg accumulated by fish in ocean margins (Cossa et al., 2017, 1996). In Senegal, upwelling occurs mainly in winter and is stronger from February to April. It produces a coastal jet confined nearshore which flows southward alongside the coast (Auger et al., 2015). Recently, coastal waters of southern Senegal were shown to originate from a northernmost upwelling area (Ndoye et al., 2017). Because the fish were collected during the active upwelling season when the coastal current is the strongest, transport of MeHg by upwelled waters might contribute to the greater Hg levels at the most southern locations (*i.e.* Saloum and Casamance; Figure 27C). This pattern was also observed for other metals like cadmium (Le Croizier et al., 2016b).

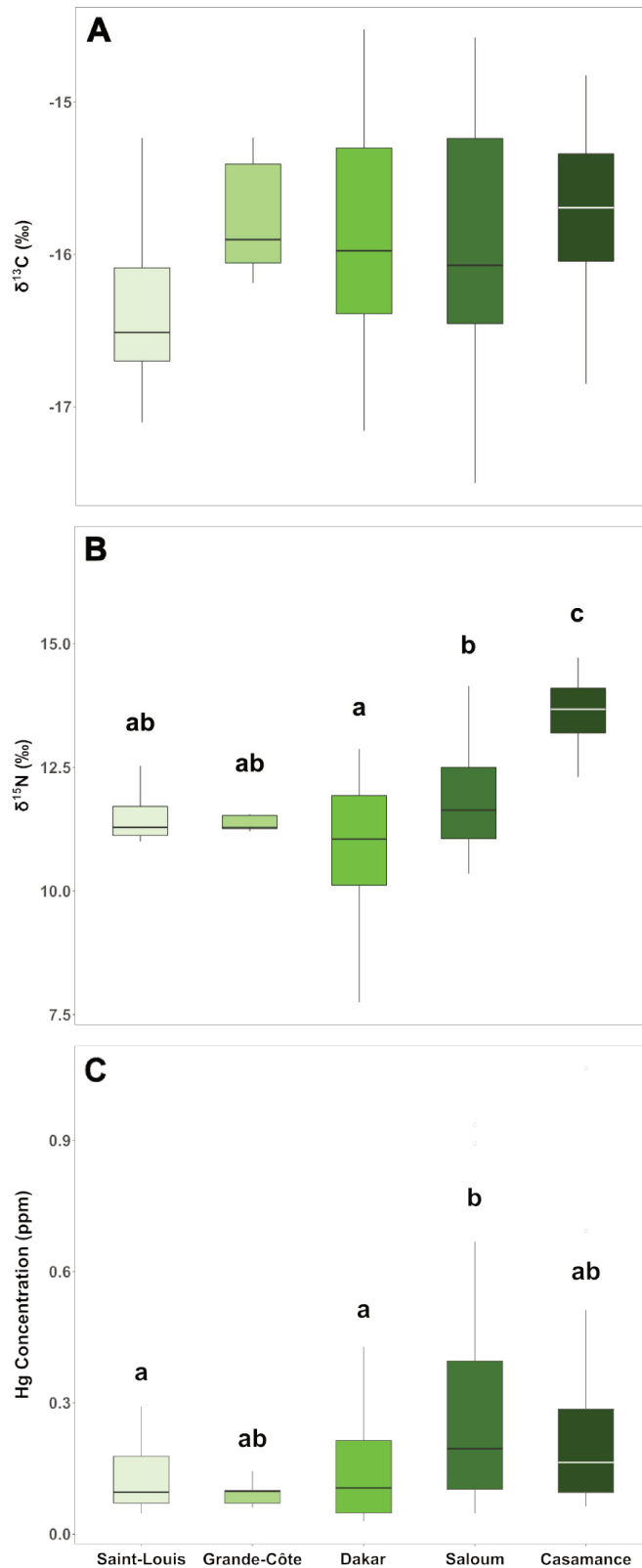


Figure 27  $\delta^{13}\text{C}$  (‰; A) and  $\delta^{15}\text{N}$  (‰; B) signatures and mercury (Hg in ppm dry weight; C) concentration in muscles of fish from various sites (“Saint-Louis”, n=24; “Grande-Côte”, n=5; “Dakar”, n=29; “Saloum”, n=44; D: “Casamance”, n=35). Different letter indicates significant difference between groups (B: KW test followed by Conover-Iman multiple comparison test with Bonferroni’s adjustment method,  $p < 0.001$ ; C: ANOVA followed by Tukey’s HSD test;  $p < 0.01$ ).

## Mercury accumulation variability at the species level

The different fish species were classified in two distinct groups according to horizontal distribution (*i.e.* offshore-inshore gradient) (Froese and Pauly, 2017). “Offshore” includes bathydemersal and oceanodromous species while “Inshore” includes coastal, brackish and estuarine species. Hg concentration in the muscle was higher in inshore fish compared to offshore ones (ANOVA;  $p < 0.001$ ) (Figure 28A). It shows that proximity to the coast implies higher Hg exposition, suggesting terrestrial Hg inputs. In the present case study, estuarine influence shown by variations in  $\delta^{15}\text{N}$  baseline may bring substantial inorganic particulate Hg to the coastal marine environment (Figure 29), as observed in other areas like the Gulf of Mexico and the Mediterranean Sea (Cossa and Coquery, 2005; Senn et al., 2010). In a previous study, higher Hg amounts were found in coastal species from Senegal during the wet season compared to the dry season (Diop and Amara, 2016). As upwelling intensity is higher during the dry season (Ndoye, 2016) whereas rainfall is higher during the wet season leading to increased runoff from land and rivers, it strengthens the hypothesis of influence of fluvial inputs among other potential Hg sources like upwelling.

In order to investigate the influence of vertical distribution (*i.e.* water column occupation), the different fish species were grouped according to their known habitat (*i.e.* pelagic, benthopelagic and demersal) (Froese and Pauly, 2017). Hg concentration increased from the surface to the bottom, demersal species exhibiting higher Hg concentrations relative to pelagic fish, while benthopelagic species showed intermediate Hg values (ANOVA followed by Tukey’s HSD test;  $p < 0.01$ ) (Figure 28B). Microbial MeHg production and subsequent mobilization from sediments is known to be a major source for Hg accumulation by coastal marine organisms including edible fish (Hammerschmidt and Fitzgerald, 2006), implying a higher Hg bioavailability for benthic organisms (Fitzgerald et al., 2007). Moreover, photodemethylation by ultraviolet radiation concurs to remove MeHg in surface water and reduce Hg bioavailability for pelagic species which feed near the surface (Lehnherr et al., 2011) (Figure 29). These two mechanisms might explain the Hg gradient found along the water column distribution of the species sampled in the present study. These results are in accordance with a previous study on a wide range of species (*i.e.* 120) from the Bay of Biscay (north-east Atlantic), in which pelagic organisms showed lower Hg concentrations than benthic and benthopelagic ones (Chouvelon et al., 2012b). Water column distribution was

moreover the factor providing the highest contribution to explaining the variability in muscle

Hg concentrations, highlighting the importance of this parameter in understanding marine fish species exposition to Hg.

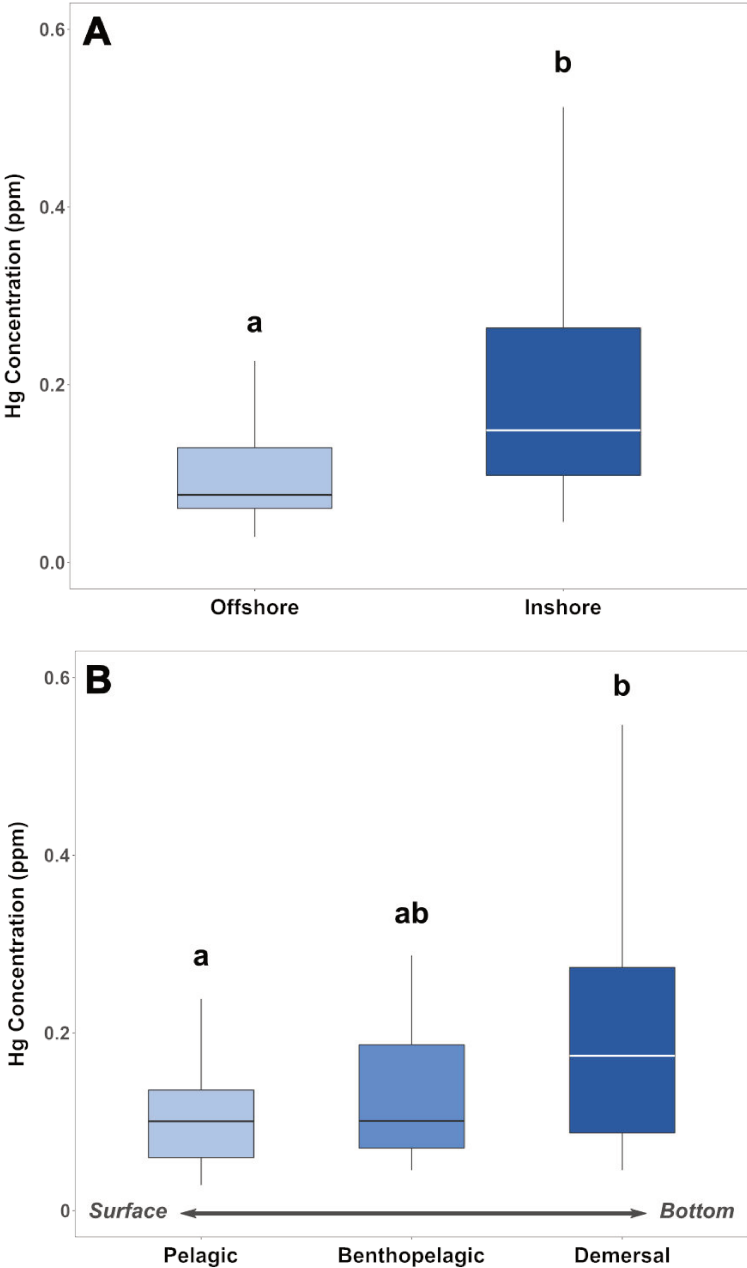


Figure 28 Mercury (Hg) concentration (ppm dry weight) in muscles of fish species according to their proximity to the coast (A) and according to water column distribution (B) (Froese and Pauly, 2017). Different letter indicates significant difference between groups (ANOVA followed by Tukey's HSD test; A:  $p < 0.001$ , B:  $p < 0.01$ ).

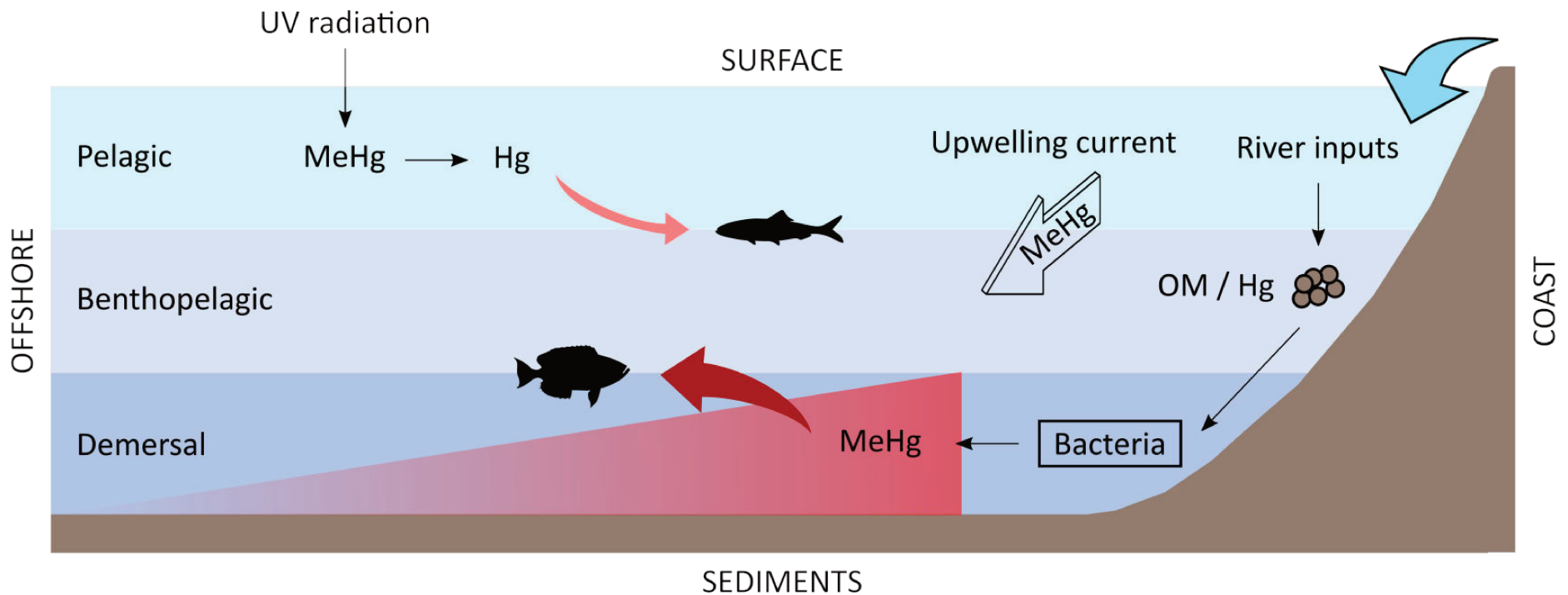


Figure 29 Schematic representation of major processes involved in Hg accumulation in marine fish species from the Senegalese coast. River inputs carry organic matter (OM) and particulate inorganic Hg to the coastal environment. After particles sinking, Hg is methylated by bacterial activity, becoming highly bioavailable for fish foraging near the sediments (*i.e.* demersal species and, to a lesser extent, benthopelagic species). Methylmercury (MeHg) is rapidly accumulated by the biota, and concentrations decrease away from the coast. MeHg is also supposed to be transported nearshore by a coastal current resulting from the upwelling activity. Near the surface, photochemical degradation of MeHg leads to formation of inorganic Hg which is poorly assimilated by pelagic fish.

## Mercury accumulation variability at the individual level

Hg accumulation was previously shown to be linked with species-specific characteristics in horizontal and vertical distribution (Figure 28). Some fish species can however display a high intraspecific variability in terms of diet composition and foraging habitat, which can be reflected in metal accumulation (Das et al., 2000; Le Croizier et al., 2016b). Intraspecific variability in horizontal distribution can lead to differences in Hg accumulation in the dusky grouper *Epinephelus marginatus* from the Southern Brazilian coast (Condini et al., 2017). Individuals sampled in an estuarine zone were more contaminated than those from an offshore bank due to anthropogenic Hg rejects in the drainage basin of the estuary. Vertical distribution can also participate to Hg accumulation variability among individuals of a same species. It can occur through ontogenetic shift in foraging habitat, like for the bluefish *Pomatomus saltatrix* which presents higher Hg accumulation in early life stage when feeding on benthic preys compared to feeding on pelagic preys during the following years (Szczebak and Taylor, 2011). It can also result from depth of occurrence as shown for the European hake from Northwestern Mediterranean, where Hg concentrations in muscle followed MeHg distribution in the water column (Cossa et al., 2012). These authors concluded that Hg bioavailability was higher for hakes inhabiting the continental slope than the continental shelf. Working at the specific level might therefore not be the more relevant method to study metal bioaccumulation. Following this postulate, individual stable isotopes values were used to investigate the role of trophic position through  $\delta^{15}\text{N}$  and foraging habitat through  $\delta^{13}\text{C}$  in Hg contamination.

Numerous studies found that Hg concentrations observed in marine fish were mainly explained by  $\delta^{15}\text{N}$ , that is, trophic level (Sackett et al., 2015; Senn et al., 2010). Hg is well known to biomagnify (*i.e.* increase with trophic level) within marine food webs (McMeans et al., 2010), making  $\delta^{15}\text{N}$  a primary driver for Hg accumulation. In the present study,  $\delta^{15}\text{N}$  varied among locations so that the link between  $\delta^{15}\text{N}$  and Hg was only investigated at the local level. Hg concentration in fish muscle was found to be correlated to  $\delta^{15}\text{N}$  in Saint-Louis (Figure 30A,  $p < 0.001$ ) and Dakar (Figure 30B,  $p < 0.001$ ) while no correlation was observed in Saloum (Figure 30C) and Casamance (Figure 30D). In the first two sites, Hg accumulation followed trophic position as frequently observed in fish communities. In Saloum and Casamance, the lack of observed biomagnification can be attributed to the limited  $\delta^{15}\text{N}$

gradient within these fish communities compared to those from northern sites. Indeed, a previous study about bioaccumulation of other metal elements than Hg found a three steps gradient in the  $\delta^{15}\text{N}$  values of fish from Dakar, while those from Casamance displayed only a two step gradient (Le Croizier et al., 2016b). These findings suggest that  $\delta^{15}\text{N}$  would not be a sufficient parameter to explain Hg accumulation variability among fish with too close trophic level. Furthermore, northern ecosystems (i.e. Saint-Louis and Dakar) may support only one main nitrogen source of marine origin, while southern sites (i.e. Saloum and Casamance) may display two main nitrogen sources, one of marine origin and the second of estuarine or upwelling origin. Multiple nitrogen sources may thus prevent to observe classical correlation between Hg and  $\delta^{15}\text{N}$  in locations influenced by estuarine inputs.

Because both vertical and horizontal distribution is reflected in  $\delta^{13}\text{C}$ , this marker can give confounding information concerning water column distribution and proximity to coast. However, it globally allows discriminate pelagic/offshore from demersal/inshore habits of the fish.  $\delta^{13}\text{C}$  did not vary significantly with location in our study (Figure 27A), but  $\delta^{13}\text{C}$  values in fish from Saloum station displayed a particular pattern. While low  $\delta^{13}\text{C}$  values are generally attributed to pelagic/offshore foraging habitat in marine food webs, organisms from areas submitted to terrestrial inputs like estuaries can be depleted in  $^{13}\text{C}$  due to the lowest  $\delta^{13}\text{C}$  of terrestrial particular organic matter (POM) compared to marine POM (Cresson et al., 2014; Darnaude, 2005). It can lead to the observation of low  $\delta^{13}\text{C}$  in fish however known to exhibit coastal benthic habits. In the fish sampled off the Saloum estuary, the three species displaying the lowest  $\delta^{13}\text{C}$  values were *Chelidonichthys gabonensis*, *Pseudupeneus prayensis* and *Dentex canariensis* ( $\delta^{13}\text{C} = -16.96 \pm 0.35 \text{ ‰}$ ,  $-16.93 \pm 0.55 \text{ ‰}$  and  $-16.54 \pm 0.37 \text{ ‰}$  respectively), all described as coastal and demersal species (Table 1). It thus suggests that these low  $\delta^{13}\text{C}$  values reflected a terrestrial influence due to inputs from the Saloum and Gambia River estuaries rather than offshore/pelagic signatures (Figure 31A). In fish from this site, Hg levels increased for both the lowest  $\delta^{13}\text{C}$  (terrestrial influence) and the highest  $\delta^{13}\text{C}$  (inshore/demersal) ( $p < 0.001$ ), highlighting the higher Hg accumulation of individual displaying inshore and demersal foraging. Besides the local trend off the Saloum estuary, as  $\delta^{13}\text{C}$  pattern was similar between sites, the link between Hg and  $\delta^{13}\text{C}$  was investigated confounding fish from all remaining locations. A positive correlation was also found between individual Hg concentrations and  $\delta^{13}\text{C}$  values ( $p < 0.001$ ; Figure 31B), strengthening the involvement of coastal environment and sediments in individual Hg



exposition. This link between Hg level and inshore/demersal affinity inferred by  $\delta^{13}\text{C}$  was also found in fish from other marine environments (Bank et al., 2007; Goutte et al., 2015).

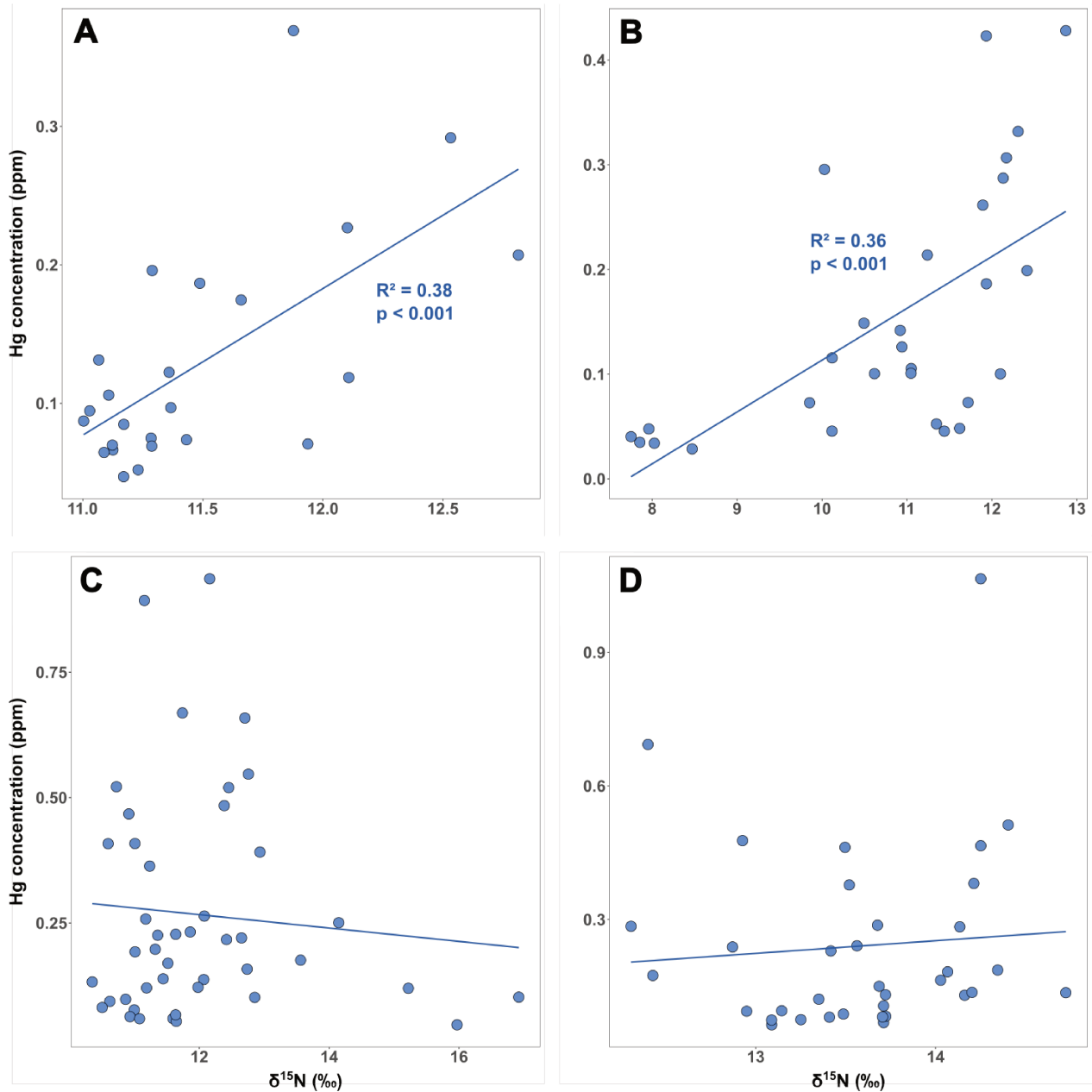


Figure 30 Mercury (Hg) concentration (ppm dry weight) in muscles of individual fish vs. muscle  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) signature from various sites (A: “Saint-Louis”; B: “Dakar”; C: “Saloum”; D: “Casamance”). Data fit a linear curve in A and B but not in C and D. “Grande Côte” station was not shown because only 5 individuals were sampled.

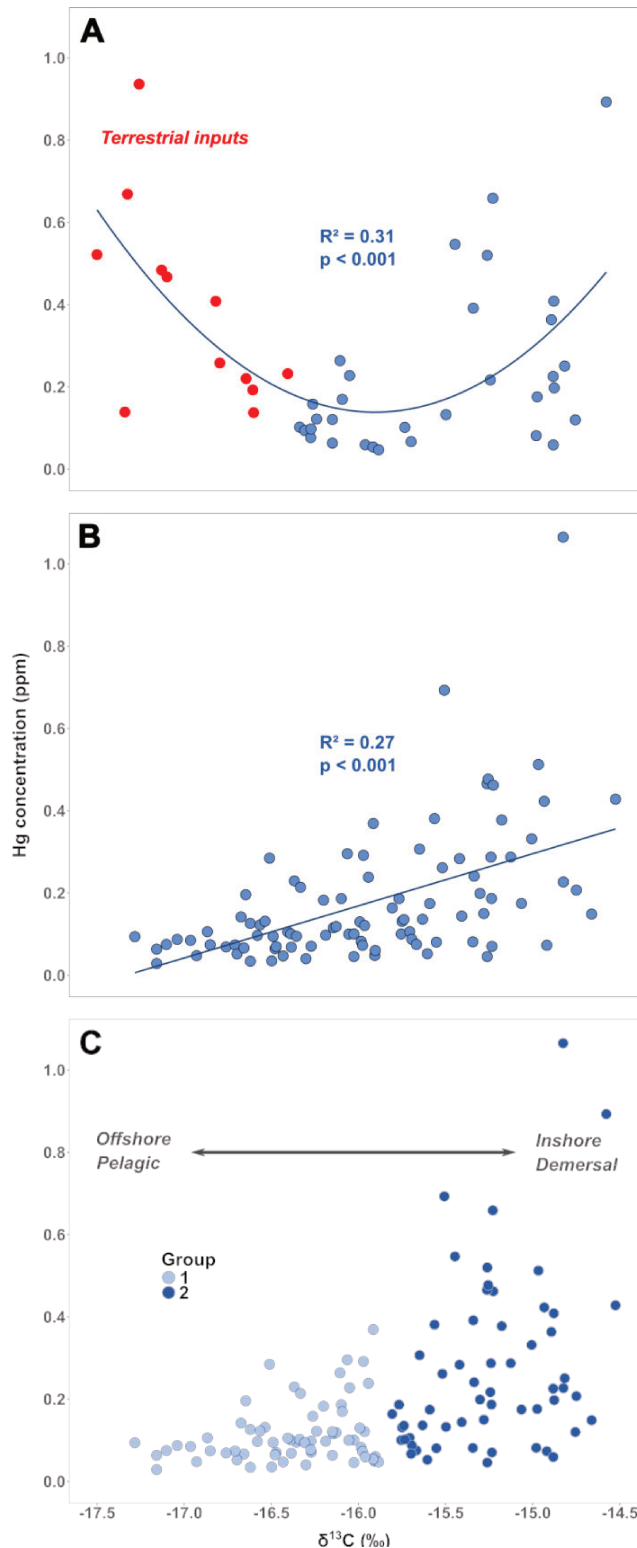


Figure 31 Mercury (Hg) concentration (ppm dry weight) in muscles of individual fish vs. muscle  $\delta^{13}C$  (‰) signature from “Saloum” station (A), from various sites (*i.e.* “Saint-Louis”, “Grande Côte”, “Dakar”, “Casamance”); B) and from all confounded sites except red points from Saloum (C). Data fit a polynomial curve in A, while data fit a linear curve in B. The former is due to the low  $\delta^{13}C$  of the red-colored individuals despite their well known coastal ecology, suggesting influence of terrestrial input more than offshore  $\delta^{13}C$  signature. C: The two groups determined through k-means clustering on individual  $\delta^{13}C$  values explained 71.6 % of the observed variability and significantly differed in  $\delta^{13}C$  values (ANOVA,  $p < 0.001$ ).

To investigate intraspecific variability in terms of foraging habitat, individual fish were grouped according to their carbon source (*i.e.* group 1: lowest  $\delta^{13}\text{C}$  suggesting offshore/pelagic habits and group 2: highest  $\delta^{13}\text{C}$  indicating inshore/demersal affinity) (Figure 31C). Individuals from the three species from Saloum discussed above were excluded from the analysis since their terrestrial  $\delta^{13}\text{C}$  signature would not assign them in a group reflecting their coastal/benthic described ecology. The k-means clustering in two groups explained 71.6 % of the observed variability in Hg content, attesting the relevance of this partitioning inferred from  $\delta^{13}\text{C}$  values. Half of the species included in the clustering were split between the two groups (*i.e.* Group: “1 and 2” in table 15), highlighting the great discrepancy in habitat occupation of individuals from a same species. Despite this high intraspecific variability, Hg bioaccumulation followed the same pattern as found at the species level, with offshore/pelagic fish being less contaminated than inshore/demersal ones (KW,  $p < 0.001$ ) (Figure 32).

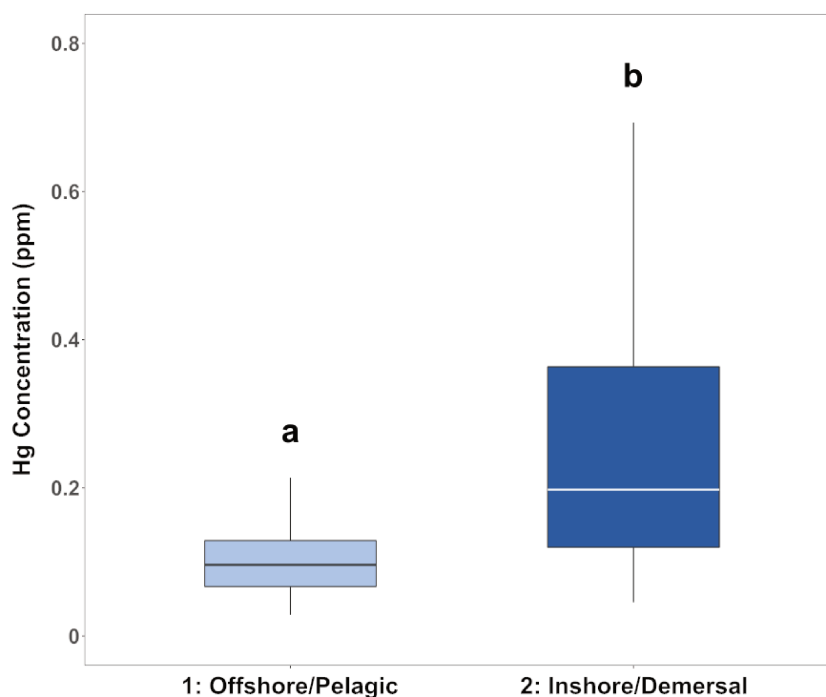


Figure 32 Mercury (Hg) concentration (ppm dry weight) in muscles of fish according to  $\delta^{13}\text{C}$  clustering. Group 1: offshore/pelagic vs. 2: inshore/demersal habits. Different letter indicates significant difference between groups (KW test followed by Conover-Iman multiple comparison test with Bonferroni's adjustment method;  $p < 0.001$ ).

## Impact of Hg concentrations on consumer health

Conversely to other toxic metal elements like cadmium, which are poorly assimilated from food (Le Croizier, 2017), more than 95 % of MeHg is absorbed from the intestinal tract after ingestion and can impair human health mainly through neurological damages (Bosch et al., 2016). As fish consumption constitutes the main pathway for Hg exposition (Driscoll et al., 2013) and fish exhibited high inter and intraspecific variability in Hg levels, attention should be focused on determining which fish are safe or should be avoided for human consumption. In the present study, all individuals presented muscular Hg concentration below the current maximum acceptable limit for seafood consumption (see Supporting Information) set by both the European Union and the Food and Agriculture Organization of the United Nations, which is 0.5 ppm ww for the species investigated here (EU, 2006; FAO, 2003). However, considering the Provisional Tolerable Weekly Intake (PTWI) set at 1.6  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (bw) for MeHg (JECFA (FAO/OMS), 2007) and assuming that nearly all the bioaccumulated Hg is in its organic form (Bloom, 1992), consumption of some species from southern locations like Saloum and Casamance should be limited. Indeed, the quantity of muscle tissue consumed per day by a 70 kg person should not exceed 160 g for *Dicologlossa hexophthalma* 145 g for *Pseudupeneus prayensis*, 133 g for *Plectorhinchus mediterraneus* and 114 g for *Caranx rhonchus* (Table 2). As marine products represent the main source of protein intake for the population of Senegal especially in southern areas (FAO, 2006), overconsumption of some coastal demersal species could be of sanitary concern regarding human exposition to Hg.

## Acknowledgments

The authors thank greatly Jean Raffray for the identification and the dissection of the fish. Samples used in this study were collected during a scientific cruise (doi, 10.17600/14001400) of the BMBF - IRD AWA Project Ecosystem Approach to the management of fisheries and the marine environment in West African waters (01DG12073E). We thank Mohamed Taleb (IMROP) and Mor Sylla (CRODT) for the onboard sorting of samples. This work was financially supported by the French National Research Agency project ANR-11-CEPL-0005 EPURE.



# DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les zones d'upwelling telles que le courant des Canaries en Afrique de l'ouest comptent parmi les écosystèmes marins les plus productifs en termes de biomasse et sont ainsi les plus exploitées par l'Homme, produisant près d'un cinquième des captures marines mondiales (Fréon et al., 2009). Ces écosystèmes côtiers sont de plus soumis à une pression anthropique responsable de pollutions locales telles que la contamination par les éléments métalliques. A ces rejets d'origine terrestre, viennent s'ajouter des phénomènes naturels augmentant la biodisponibilité des métaux, tels que la remise en suspension des éléments par les remontées d'eaux profondes induites par les courants d'upwelling. Ces différents processus conduisent à l'assimilation et l'accumulation des métaux par les organismes marins, et leur transmission dans la chaîne alimentaire jusqu'aux consommateurs finaux incluant l'Homme. Certains métaux comme le cadmium (Cd) présentent une toxicité pour les animaux et l'Homme et font donc l'objet de recommandations sanitaires, notamment sur les quantités ingérées à ne pas excéder par semaine et en fonction de la masse corporelle. Ces recommandations peuvent toutefois être sujettes à caution, les concentrations métalliques retrouvées dans les différents organismes consommés tels que les poissons marins étant largement variables en fonction de l'espèce considérée et/ou des différents comportements individuels en termes de distribution spatiale et de régime alimentaire.

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail de thèse étaient de caractériser les paramètres déterminant la variabilité de l'accumulation des métaux par les poissons marins, au moyen de deux approches, l'une portant sur les particularités physiologiques et l'autre sur les mécanismes écologiques régissant la bioaccumulation. Une comparaison expérimentale des cinétiques d'accumulation et d'élimination du Cd au niveau tissulaire en lien avec les concentrations en métallothionéines (MT), protéines ayant de hautes affinités pour les ions métalliques, a d'abord été menée chez deux espèces de poissons présentes dans le courant des Canaries (Article 1, soumis). La répartition subcellulaire du Cd au sein des hépatocytes ainsi que son interférence avec les métaux essentiels ont ensuite été étudiées chez ces mêmes espèces, dans le but d'évaluer leurs capacités de détoxification et d'élimination du Cd (Article 2, soumis). Concernant l'analyse des paramètres écologiques, la mesure des concentrations métalliques a été comparée à différents indicateurs de l'habitat et du régime alimentaire chez de nombreuses espèces provenant des côtes du Sénégal. Les rapports isotopiques du carbone et de l'azote ainsi que la composition en acides gras des lipides de

réserve ont d'abord permis d'évaluer l'importance de la composition des proies dans le transfert trophique des métaux jusqu'aux poissons (Article 3 : Le Croizier et al., 2016). Les isotopes stables ont enfin été utilisés pour caractériser le rôle de l'habitat dans l'exposition des poissons du Sénégal à un métal toxique modèle : le mercure (Article 4, soumis).

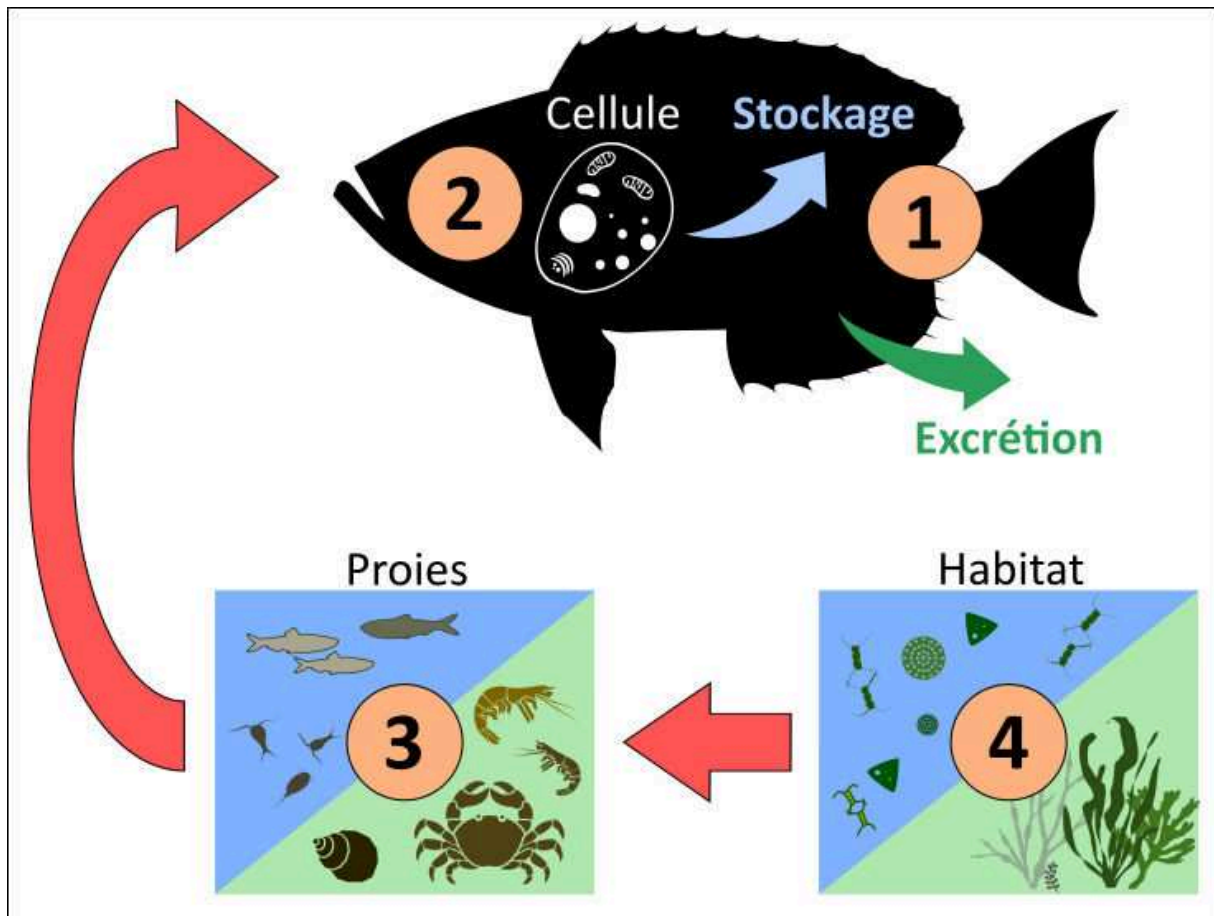


Figure 33 Schéma récapitulatif des 4 principaux paramètres étudiés, déterminant les concentrations métalliques chez les poissons marins. 1) Les cinétiques d'accumulation et d'élimination dans différents organes; 2) la répartition subcellulaire des métaux; 3) La composition des proies; 4) L'occupation de l'habitat. Les flèches représentent les flux d'éléments métalliques entre les compartiments.



# 1. LA BIOACCUMULATION DES METAUX PAR LES POISSONS MARINS

---

Les résultats obtenus dans le chapitre 1 ont montré une accumulation du Cd plus rapide dans le foie du bar comparé à la sole. Ces observations suggèrent un transport facilité à travers la paroi intestinale, conduisant sans doute à une plus grande efficacité d'assimilation (EA), et témoignent ainsi de l'importance de l'EA dans les différences d'accumulation retrouvées entre espèces. A partir du foie, le Cd a de plus été transporté jusqu'au muscle plus rapidement et en plus grande proportion chez le bar. L'excrétion biliaire du métal est également plus importante chez cette espèce en proportion de la quantité de Cd dans le foie. Ces résultats, mis en relation avec les concentrations en métallothionéines (MT) plus élevées chez le bar, présagent d'une implication des MT dans les cinétiques d'accumulation et d'élimination du Cd. Il est d'abord possible que des concentrations en MT plus élevées soient également retrouvées dans les entérocytes du bar, impliquant une meilleure détoxification du Cd et un maintien des capacités d'assimilation conduisant à une plus forte accumulation. De plus, les MT semblent faciliter la sortie du Cd hors des hépatocytes : soit vers le milieu externe via la sécrétion de bile dans l'intestin puis l'élimination du Cd par les fèces, soit à destination d'autres organes tels que le muscle. En effet, dans le chapitre 2 nous avons montré chez le bar que plus de la moitié du Cd était lié à la fraction cellulaire contenant les MT. Au vu de l'élimination effective du Cd à l'échelle du foie entier, équivalente à environ 60 % de la concentration de départ après 2 mois de dépuración, cela confirme l'excrétion des complexes Cd-MT hors des cellules du foie.

Cependant, même si le transport du Cd par les MT du foie vers d'autres organes tels que les reins est soupçonné chez les mammifères depuis de nombreuses années (Chan et al., 1993), les mécanismes transmembranaires par lesquels les MT sont excrétées des hépatocytes sont encore mal connus (Molledo et al., 2000). Ainsi, les voies d'exocytose des complexes Cd-MT restent à caractériser (Sabolić et al., 2010; Zalups et Ahmad, 2003) de même que les transporteurs impliqués dans le transport extra-membranaire du Cd de façon générale, malgré plus de 40 ans de recherche dans ce domaine (Moulis et al., 2014).

Cette amélioration de l'élimination liée à la séquestration des métaux par les MT n'avait jusqu'à lors pas été montrée chez les vertébrés marins. En effet, à notre connaissance seuls Long et Wang (2005) ont étudié le lien entre MT et élimination chez *Terapon jarbua* et ont trouvé une corrélation négative entre concentration en MT et élimination du Cd à l'échelle du corps entier. Leur protocole comprenait toutefois une pré-exposition à l'argent et au cuivre, rendant difficile la comparaison avec nos résultats. Pan et Wang (2009) ont cependant établi pour 5 espèces de bivalves une corrélation positive très étroite ( $r^2 = 0,99$ ) entre la proportion de cuivre incluse dans la fraction cellulaire contenant les MT et la vitesse d'élimination du métal. Ces conclusion conduisent à la nécessité de reconsidérer la théorie décrivant les MT comme appartenant à une fraction impliquée uniquement dans l'accumulation, tel que décrit par exemple dans la revue de Vijver et al. (2004) (Figure 34), en leur ajoutant un rôle dans l'élimination des métaux. De même, la forme majeure d'élimination du Cd à partir des hépatocytes chez la sole semble liée à la précipitation du métal au sein de granules (MRG), avant leur séquestration par le système endomembranaire (i.e. réticulum endoplasmique et appareil de Golgi) et exocytose via les lysosomes. Les granules étaient en général jusqu'à présent considérés comme des puits pour l'accumulation des métaux, même si des phénomènes d'élimination du Cd à partir de cette fraction avaient déjà été observés chez les bivalves (Wallace et al., 2003).

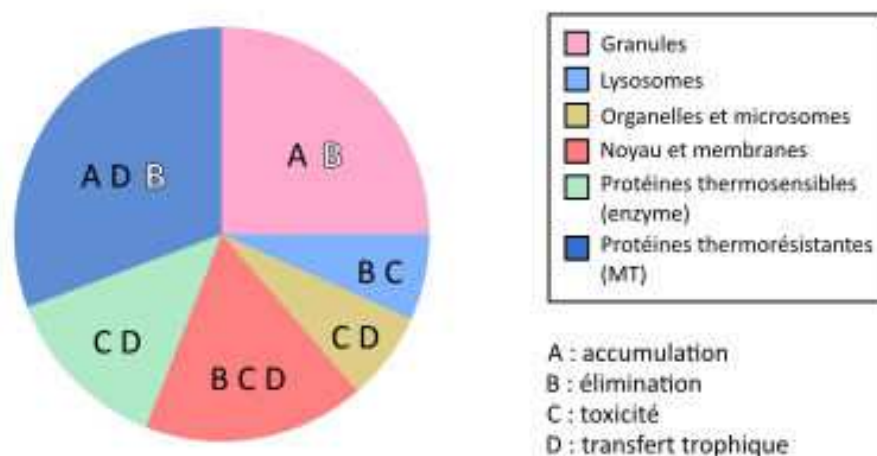


Figure 34 Hypothèses générales concernant le rôle des différentes fractions cellulaires séquestrant les métaux chez les animaux, en termes d'accumulation (A), d'élimination (B), de sensibilité à la toxicité (C) et de transfert trophique (D). La taille des fractions correspond à la répartition du Cd généralement observée. En blanc : les hypothèses suggérées par les résultats des chapitres 1 et 2 des présents travaux. Adapté de la revue de Vijver et al. (2004).

D'autre part, la plus grande allocation de Cd vers le muscle observée chez le bar dans le cadre du chapitre 1 soulève certaines questions intéressantes. En effet, notre hypothèse propose que le Cd soit conduit vers le muscle en même temps que des protéines ou des acides aminés (AA) nécessaires au renouvellement de la structure musculaire, induit par l'activité de nage permanente du bar. A contrario, les muscles de la sole étant moins sollicités de par son comportement sédentaire, le besoin en unités structurantes se veut moins important et n'impliquerait qu'un transport limité d'AA et indirectement de Cd vers le compartiment musculaire. De plus, les lipides de réserve représentent la forme majeure de stockage d'énergie chez les poissons (Tocher, 2003) et peuvent renfermer une proportion importante du Cd dans le foie (i.e. près de 30 % du Cd total, voir chapitre 2). Selon le même raisonnement que pour les protéines, il est possible que les plus forts besoins énergétiques liés à l'utilisation des muscles chez le bar, aient entraîné un transport du Cd plus important par le biais des lipides chez cette espèce comparé à la sole. Ainsi, ces hypothèses permettraient d'expliquer les fortes valeurs de Cd pouvant être observées dans le muscle de certaines espèces prédatrices très actives telles que les grands poissons pélagiques comme les espadons et les thons (Araújo et Cedeño-Macias, 2016; Kojadinovic et al., 2007), malgré l'absence de bioamplification du Cd au long de la chaîne trophique (Mathews et al., 2008; Mathews et Fisher, 2008). Dans ce contexte, il serait intéressant de caractériser les formes complexées du Cd au cours de son transport sanguin, afin d'évaluer l'importance relative des lipides et des protéines (ou acides aminés) dans l'acheminement du métal jusqu'au muscle. La formation de complexes Cd-MT semble favoriser l'excrétion biliaire du métal, comme montré pour le bar au cours des chapitres 1 et 2. Des conclusions similaires ont été tirées d'études impliquant d'autres espèces de poissons comme la tilapia du Nil *Oreochromis niloticus* et le poisson zèbre *Danio rerio*, exposés respectivement au cuivre et au sélénium (Hauser-Davis et al., 2016, 2014a). Ces auteurs ont montré, après avoir isolé les MT présentes dans la bile, que les métaux sont liés à cette fraction et que leur excrétion entraîne une diminution des concentrations métalliques hépatiques. Chez les mammifères, il semblerait au contraire que les MT inhibent la sécrétion biliaire du Cd (Klaassen et al., 2009), le Cd retrouvé dans la bile étant d'avantage lié à du glutathion réduit (GSH) (Zalups et Ahmad, 2003). La fraction de protéines thermorésistantes (HSP) étudiée au cours du chapitre 2 comprend les MT, mais également le GSH. Il serait donc intéressant de procéder à

une caractérisation précise des formes complexées du Cd dans la bile, afin de trancher quant à l'implication réelle des MT dans l'excrétion biliaire du Cd chez les poissons marins.

Malgré leur utilisation massive en tant que biomarqueur de contamination métallique en milieu naturel (Aldo Viarengo, 1999; Hauser-Davis et al., 2012b; Lionetto et al., 2001), la synthèse de métallothionéines (MT) peut être induite par de nombreux facteurs environnementaux et endogènes (Hylland et al., 1998; R. Siscar et al., 2014) et ainsi ne pas nécessairement refléter le degré d'exposition des poissons marins aux métaux (Mieiro et al., 2011). Dans le cadre des expérimentations du chapitre 1, l'accumulation de Cd n'a globalement pas conduit à la synthèse *de novo* de MT chez les deux espèces étudiées, même après exposition à la plus forte dose. Les concentrations en Cd dans la nourriture ayant été fixées en accord avec des niveaux de contamination observés chez des proies potentielles de ces espèces en milieu impacté (Bodin et al., 2013; Maanan, 2008; Rouhi et al., 2007), ces résultats confirment le manque de pertinence concernant l'utilisation des MT comme indicateur de pollution pour les poissons marins.

Cependant, notre étude a montré que les concentrations basales en MT semblaient caractéristiques de l'espèce et participaient à la variabilité d'accumulation du Cd sans synthèse supplémentaire. A notre connaissance, aucune étude n'a encore démontré de telles différences entre espèces sans les attribuer à des réponses liées aux conditions environnementales. Dans le cas de nos travaux, il est cependant possible que les concentrations en MT contrastées chez les deux espèces soient le reflet des différentes histoires de vie de ces poissons, ces derniers ne provenant pas des mêmes élevages aquacoles. Il serait donc intéressant d'approfondir cette hypothèse en maintenant à long terme des souches sauvages de différentes espèces dans les mêmes conditions d'élevage, afin de s'affranchir de l'influence environnementale. Le caractère héritable des teneurs en MT à l'échelle de l'espèce pourraient également être analysées sur les générations suivantes. Cette démarche permettrait peut-être de mettre en évidence le rôle potentiellement important d'un caractère physiologique spécifique dans la variabilité d'accumulation observée *in situ*.

## 2. ORIGINE DES ELEMENTS METALLIQUES

---

### Naturelle versus industrielle

Le chapitre 3 a montré que les schémas de contamination variaient entre une zone impactée (Dakar) et une zone moins anthropisée (Casamance). A Dakar, le réseau trophique démersal semble d'avantage sujet à la contamination métallique puisque l'accumulation est corrélée à des signatures caractéristiques de la consommation de proies benthiques. En revanche, le transfert des métaux jusqu'aux poissons a également lieu au travers du réseau trophique pélagique en Casamance. Hormis ces différentes sources d'exposition et malgré le caractère moins anthropisé de la Casamance, certaines espèces de cette région présentaient les plus fortes valeurs accumulées observées dans notre étude pour des métaux toxiques tels que le Cd. Ainsi, la plus forte concentration en Cd fut observée dans le foie du chinchard *Caranx rhonchus* pêché en Casamance, correspondant à  $43,5 \pm 18,3$  ppm de poids sec (ps), alors que la plus haute valeur trouvée dans la région Dakaroise ne dépassaient pas  $16,7 \pm 4,5$  ppm ps dans le foie du sparailon africain *Diplodus bellottii* (Table X).

Région	Espèce	n	Cd
Dakar	<i>Caranx rhonchus</i>	4	$2,5 \pm 1,1$
	<i>Boops boops</i>	5	$13 \pm 9,5$
	<i>Diplodus bellottii</i>	5	$16,7 \pm 4,5$
	<i>Pseudupeneus prayensis</i>	5	$8,9 \pm 3,8$
	<i>Scomber japonicus</i>	5	$8,2 \pm 2,6$
	<i>Trachurus trecae</i>	5	$12,5 \pm 7,7$
Casamance	<i>Caranx rhonchus</i>	5	$43,5 \pm 18,3$
	<i>Brachydeuterus auritus</i>	5	$20,4 \pm 4,4$
	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	5	$19,5 \pm 7,6$
	<i>Galeoides decadactylus</i>	5	$5,3 \pm 1,3$
	<i>Selene dorsalis</i>	5	$6,5 \pm 2,8$
	<i>Sphyraena guachancho</i>	5	$2 \pm 0,8$

Tableau 16 Concentration moyenne (ppm de poids sec) en cadmium (Cd) dans le foie de différentes espèces pêchées à Dakar et en Casamance. n : nombre d'individus. Issu de ce travail de thèse.

Cette constatation pose la question de la provenance de métaux tels que le Cd dans l'environnement marin de la Casamance qui, contrairement à Dakar, n'est pas directement impacté par des rejets industriels ou urbains. L'hypothèse d'un transport de ces éléments par les courants côtiers a été envisagée pour notre cas d'étude, cependant une caractérisation plus précise de la provenance de ces éléments serait intéressante. L'utilisation des rapports isotopiques des métaux dans la détermination de leur origine connaît un essor croissant ces dernières années. En effet, à l'instar des éléments plus classiquement utilisés (azote, carbone, hydrogène, oxygène, soufre...), de nombreux processus naturels ou industriels conduisent à un fractionnement isotopique des éléments métalliques (Wiederhold, 2015). Il a par exemple été montré que les procédés industriels tels que le raffinage de minerais pouvaient générer un fractionnement du Cd, entraînant un enrichissement du résidu en isotopes lourds après évaporation préférentielle des isotopes légers (Cloquet et al., 2006; Shiel et al., 2010). Ce fractionnement a permis d'identifier la contribution relative de sources anthropiques et naturelles (upwelling) chez plusieurs espèces de bivalves de différentes régions (Shiel et al., 2013, 2012). Cet outil serait particulièrement utile dans la détermination de l'origine du Cd accumulé par les organismes marins du courant des Canaries, et dont la provenance ne fait pas l'objet d'un consensus à l'heure actuelle (Auger et al., 2015; Waeles et al., 2016). Cette approche nécessite toutefois quelques prérequis, comme la connaissance du degré de fractionnement de l'élément lors de son transfert entre les différents maillons de la chaîne trophique. Il a ainsi été montré une légère assimilation préférentielle des isotopes légers du Cd par le phytoplancton, résultant en un enrichissement en isotopes lourds dans l'eau de mer (Horner et al., 2013; Ripperger et al., 2007). A notre connaissance, aucune étude n'a encore caractérisé le degré de fractionnement isotopique du Cd le long d'une chaîne trophique marine, mais les résultats obtenus sur d'autres métaux tels que le zinc suggèrent un enrichissement en isotopes légers avec l'augmentation du niveau trophique (Jaouen et al., 2016). Il pourrait ainsi être intéressant de mesurer les rapports isotopiques du Cd dans l'aliment et les organes des deux espèces de poissons utilisés dans le cadre des chapitres 1 et 2. Cela permettrait d'évaluer si un fractionnement a lieu lors de l'assimilation, et s'il peut dépendre de l'espèce ou de l'organe considéré, comme montré pour d'autres métaux chez les mammifères, lié entre autres à des différences de transporteurs membranaires (Balter et al., 2013). De plus, même si la plupart des procédés industriels conduisent à un fractionnement isotopique du Cd, son

rapport isotopique le plus employé (i.e.  $\delta^{114}\text{Cd}$ ) varie fortement dans les résidus en fonction du processus considéré (Martinková et al., 2016). Ce constat nécessite donc la caractérisation des signatures isotopiques des sources potentielles de contamination pour pouvoir identifier avec précision la provenance du métal.

## Voies de transfert trophique

Les rapports isotopiques du mercure (Hg) ont quant à eux été d'avantage exploités dans la caractérisation des sources naturelles et des voies de transfert de ce contaminant durant ces dernières années. Le Hg subit deux types de fractionnement liés à des processus naturels : le fractionnement dépendant de la masse (MDF) et le fractionnement indépendant de la masse (MIF). Le MDF résulte de nombreuses actions incluant la méthylation microbienne (Rodríguez-González et al., 2009), alors que le MIF est principalement dû à la dégradation photochimique (Bergquist et Blum, 2007). En revanche, les rapports isotopiques du Hg sont généralement conservés lors des transferts trophiques et les consommateurs reflètent la signature isotopique de leurs proies. Cette conservation a été montrée en milieu contrôlé pour différentes espèces de poissons prédateurs comme la perchaude *Perca flavescens* (Kwon et al., 2012), la sérieole couronnée *Seriola dumerili* (Kwon et al., 2013) et le thon rouge du pacifique *Thunnus orientalis* (Kwon et al., 2016), même si le temps nécessaire au renouvellement total de la signature isotopique du Hg varie entre les espèces (i.e. environ 30 jours pour la sérieole contre 700 jours pour le thon). De plus, comme les différents processus induisant un fractionnement différent entre les milieux, les signatures isotopiques du Hg permettent de caractériser les sources alimentaires et les habitats à l'origine de la contamination des différentes espèces de poissons marins, en discriminant des affinités estuariennes *versus* océaniques (Li et al., 2016; Senn et al., 2010) ou benthiques *versus* pélagiques (Gehrke et al., 2011). Enfin, la large majorité du mercure se trouvant sous forme méthylée (i.e. MeHg) chez les organismes aquatiques, un protocole a été mis en place récemment par Masbou et al. (2015) afin d'appliquer la méthode de l'analyse isotopique des composés spécifiques (CSIA) au carbone contenu dans le groupement méthyle du MeHg, et ainsi pouvoir caractériser la chaîne alimentaire par laquelle ce contaminant est amplifié jusqu'aux consommateurs. Ces outils s'avèreraient particulièrement utiles pour confirmer les résultats obtenus au cours du chapitre 4. En effet, ils permettraient peut-être de valider

l'hypothèse d'une origine principalement côtière du mercure (*via* apports des fleuves ou du courant côtier d'upwelling) suggérée par la contamination supérieure des poissons aux préférences alimentaires côtières et benthiques, déterminées grâce aux isotopes stables du carbone et de l'azote.

### 3. TRACEURS ECOLOGIQUES

---

#### Divergence entre traceurs

Malgré l'utilisation éprouvée des isotopes stables du carbone et de l'azote pour déterminer le niveau trophique ( $\delta^{15}\text{N}$ ), l'habitat d'alimentation ( $\delta^{13}\text{C}$ ) et la niche trophique (combinaison du  $\delta^{15}\text{N}$  et du  $\delta^{13}\text{C}$ ), ces outils présentent des limites. Hussey et al. (2015) ont déterminé le niveau trophique de 13 espèces de grands requins d'Afrique du Sud basé sur 3 différents types d'analyses : le  $\delta^{15}\text{N}$  du muscle, le  $\delta^{15}\text{N}$  sur acides aminés et le contenu stomacal. Ils ont obtenu des estimations très différentes en fonction de la méthode utilisée pour certains requins, avec des écarts de plus d'un niveau trophique pour une même espèce. De même, Sardenne et al., (2016) ont évalué la niche trophique de 3 espèces de thons tropicaux dans l'ouest de l'océan Indien grâce à l'analyse du  $\delta^{15}\text{N}$  et  $\delta^{13}\text{C}$  ainsi que la composition en acide gras des lipides neutres. Concernant le thon obèse *Thunnus obesus* et l'albacore *Thunnus albacares* de plus d'1 mètre, ils n'ont établi aucun chevauchement des niches trophiques des deux espèces à partir de la signature isotopique du muscle, alors que ce chevauchement était de plus de 70 % d'après la composition en acide gras du muscle. Ces études montrent la contradiction des résultats pouvant être obtenus à partir de différents traceurs trophiques, et ainsi l'interprétation parfois erronée que peut entraîner l'utilisation d'un seul outil quant à la détermination des caractéristiques écologiques des poissons marins.

Les espèces échantillonnées en Casamance présentent des signatures moyennes en  $\delta^{13}\text{C}$  variables (Figure 35A) mais approximativement le même niveau trophique d'après les valeurs de  $\delta^{15}\text{N}$ . Les niches trophiques ont été déterminées à partir des 3 types d'analyses, permettant d'obtenir des résultats très différents concernant le chevauchement des niches



spécifiques. On note par exemple que le petit capitaine *Galeoides decadactylus* montre des valeurs de  $\delta^{13}\text{C}$  intermédiaires (Figure 35A) et une niche trophique isotopique incluse dans celle du barracuda *Sphyraena guachancho* et de la carangue *Selene dorsalis* (Figure 35B), suggérant une compétition trophique entre *G. decadactylus* et ces deux espèces. Cependant, le petit capitaine se différencie par une concentration importante en acides gras d'origine bactérienne indiquant une alimentation majoritairement composée de proies benthiques, comme discuté au cours du chapitre 3. Par conséquent, sa niche trophique déterminée par l'analyse des AG ne montre pas de compétition alimentaire avec aucune des autres espèces (Figure 35C).

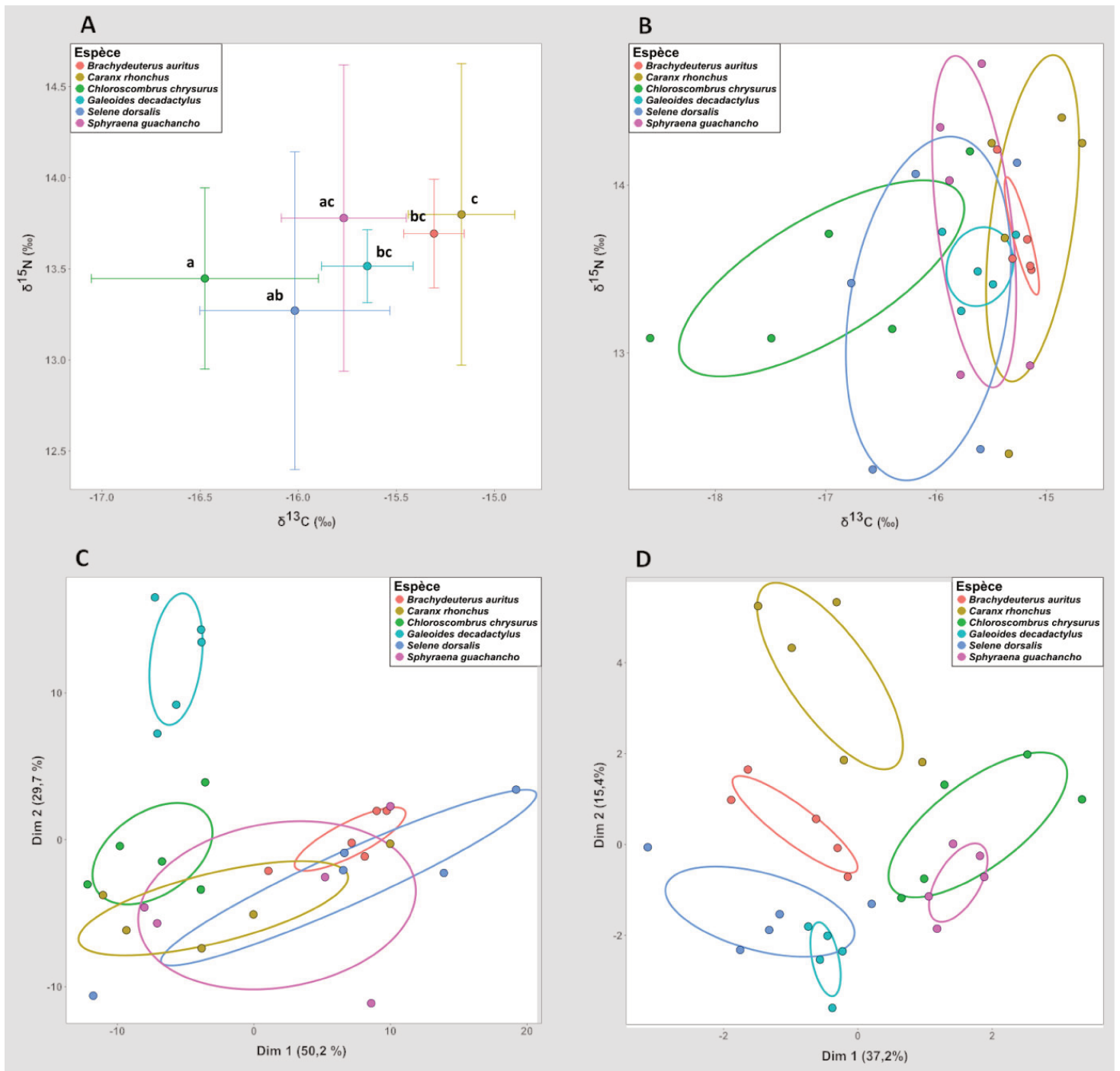


Figure 35 Signatures isotopiques (A) et niches trophiques spécifiques, correspondant à l'aire de l'ellipse standard corrigée pour les petits nombres d'échantillons (SEAC), calculée par approche bayésienne grâce au package SIBER (Stable Isotope Bayesian Ellipses in R) (Jackson et al., 2011). Les ellipses ont été établies à partir des signatures isotopiques des individus (B), mais également à partir de leurs coordonnées dans un espace bidimensionnel obtenu après analyse en composantes principales (ACP) à partir des compositions en acides gras (AG) (C) et des concentrations en métaux (D). Différentes lettres indiquent des différences significatives entre les valeurs de  $\delta^{13}\text{C}$  entre les espèces (ANOVA suivie d'un test HSD de Tukey ;  $p < 0,05$ ). Issu de ce travail de thèse.

Enfin, comme les métaux sont majoritairement assimilés par voie trophique en milieu marin et varient en fonction du régime alimentaire (voir chapitre 3), ils peuvent également renseigner sur les préférences alimentaires des poissons. Concernant les espèces échantillonnées en Casamance, deux interactions trophiques sont suggérées par les concentrations métalliques (i.e. entre *Chloroscombrus chrysurus* et *Sphyraena guachancho*, ainsi qu'entre *Galeoides decadactylus* et *Selene dorsalis*) (voir Tableau 17).

	IS	AG	ME
Ba - Cc	0	0	0
Ba - Cr	<b>77</b>	<b>8</b>	0
Ba - Gd	0	0	0
Ba - Sd	0	<b>20</b>	0
Ba - Sg	0	<b>65</b>	0
Cc - Cr	0	<b>5</b>	0
Cc - Gd	0	0	0
Cc - Sd	<b>53</b>	0	0
Cc - Sg	<b>13</b>	<b>17</b>	<b>55</b>
Cr - Gd	<b>9</b>	0	0
Cr - Sd	<b>1</b>	<b>38</b>	0
Cr - Sg	<b>5</b>	<b>82</b>	0
Gd - Sd	<b>91</b>	0	<b>42</b>
Gd - Sg	<b>95</b>	0	0
Sd - Sg	<b>74</b>	<b>67</b>	0

**Tableau 17** Chevauchement des niches isotopiques (i.e. pourcentage de l'aire la plus petite incluse dans l'aire la plus grande) entre les 6 espèces pêchées en Casamance, à partir des analyses d'isotopes stables (IS), d'acides gras (AG) et de métaux (ME). Ba : *Brachydeuterus auritus* ; Cc : *Chloroscombrus chrysurus* ; Cr : *Caranx rhonchus* ; Gd : *Galeoides decadactylus* ; Sd : *Selene dorsalis* ; Sg : *Sphyraena guachancho*). Issu de ce travail de thèse.

*G. decadactylus* et *S. dorsalis* sont tous les deux connus pour se nourrir en partie de crustacés benthiques (Caverivière, 1993; Diouf, 1996), ce qui rend réaliste une possible compétition trophique. En revanche, le barracuda *S. guachancho* est un poisson prédateur alors que *C. chrysurus* est un filtreur (Faye et al., 2011), empêchant toute compétition trophique. *C. chrysurus* fait cependant partie du régime alimentaire du barracuda, suggérant dans ce cas un transfert des métaux de proie à prédateur. Quelle que soit la nature des interactions trophiques, seuls deux chevauchements de niches trophiques sont déduits des concentrations métalliques (ME), contre 9 à partir des isotopes (IS) et 8 à partir des acides gras (AG) (Tableau 17).

Cet écart entre les niches trophiques issues des différents traceurs met en évidence la nécessité de considérer avec précaution les interprétations issues de ces outils utilisés individuellement. En revanche, même s'ils peuvent donner lieu à des informations parfois contrastées, les interprétations issues d'informations communes à leur utilisation conjointe associées aux connaissances bioécologiques des espèces permettent de s'approcher avec plus de robustesse de la réalité.

D'autre part, le faible nombre d'interactions obtenues à partir des compositions métalliques suggère que, même si elles sont soumises à l'influence des paramètres écologiques (voir chapitres 3 et 4), les concentrations en métaux résultent pour partie de caractéristiques physiologiques propres à chaque espèce (voir chapitre 1 et 2). Il est également possible que l'utilisation des isotopes et des acides gras conduise à une sous-estimation de la diversité trophique réelle au sein d'une communauté, due entre autres à la résolution en deux dimensions des IS et au forçage métabolique des AG en bas de chaîne alimentaire.

## **Les métaux : traceurs de la variabilité intraspécifique**

Si les facteurs physiologiques conduisent à une part significative de la variabilité d'accumulation observée entre espèces, les éléments métalliques semblent toutefois être de bons traceurs écologiques pour des individus ayant les mêmes contraintes physiologiques, c'est-à-dire appartenant à la même espèce, mais confrontés à des conditions environnementales différentes.

Cette approche a été beaucoup utilisée chez les mammifères marins. En effet, le Cd permet par exemple de discriminer les dauphins communs *Delphinus delphis* aux habitudes océaniques dans le Golfe de Gascogne, qui présentent des concentrations rénales en Cd 12 fois supérieures aux individus néritiques, correspondant à l'ingestion de différentes espèces de céphalopodes (Lahaye et al., 2005). De même, des éléments non-essentiels tels que l'argent et l'étain montrent des concentrations différentes entre deux populations de dauphins de la Plata *Pontoporia blainvillei*, séparant les individus estuariens des dauphins aux habitudes plus marines (Romero et al., 2016).

Concernant les poissons, Das et al. (2000) ont retrouvé, au sein d'une population de thons germans *Thunnus alalunga*, deux groupes discriminés par leurs concentrations hépatiques

en Cd et en Fe. Ces groupes présentaient également des signatures isotopiques du foie différentes pour le carbone et l'azote, indiquant l'utilisation de niches trophiques distinctes au sein d'une même espèce. Ces différences de signature métallique et isotopique ne sont cependant pas retrouvées dans le muscle, suggérant une divergence récente et sans doute opportuniste des comportements alimentaires.

De même, parmi les espèces échantillonnées en Casamance dans le cadre de ces travaux de thèse, *Chloroscombrus chrysurus* présentait deux groupes distincts, séparés par leurs concentrations en Hg ainsi que par leurs compositions isotopiques (Figure 36). Ainsi, malgré la faible sélectivité des proies dans le comportement alimentaire de *C. chrysurus*, qui se nourrit majoritairement de particules pélagiques (Faye et al., 2011), les métaux non-essentiels tels que le mercure permettent d'identifier des individus aux niches trophiques différentes, variant pour cette espèce de plus d'1 ‰ en  $\delta^{13}\text{C}$  et  $\delta^{15}\text{N}$ .

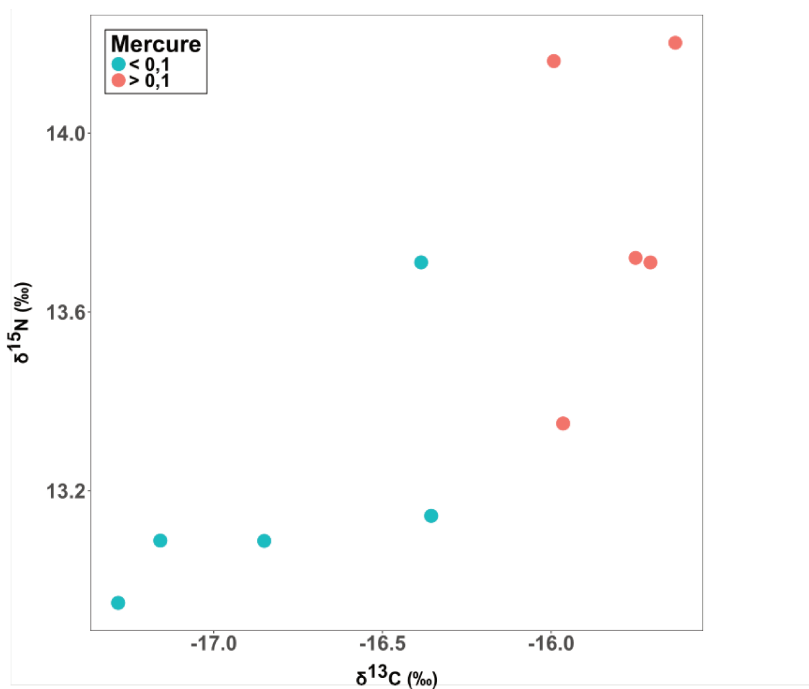


Figure 36 Compositions isotopiques de *Chloroscombrus chrysurus* (n = 10) échantillonnés en Casamance au cours de ce travail de thèse. Les couleurs indiquent deux groupes différenciés par leur concentrations en mercure dans le muscle (ppm) (ANOVA ; p < 0,001). Les groupes présentent également différentes valeurs de  $\delta^{13}\text{C}$  (ANOVA ; p < 0,01) et de  $\delta^{15}\text{N}$  (ANOVA ; p < 0,05) dans le muscle. Issu de ce travail de thèse.

Condini et al. (2017) ont également montré que les concentrations en Hg dans le muscle du mérrou brun *Epinephelus marginatus* sont plus élevées chez des individus prélevés en zone estuarienne que chez ceux pêchés plus au large des côtes, et ce pour une même classe de taille.

Ces différents exemples illustrent ainsi la pertinence de l'utilisation des métaux comme traceurs du régime alimentaire et/ou de l'habitat, lorsque l'on s'affranchit des biais liés aux différences interspécifiques et ontogéniques.

Enfin, Soto et al. (2016) ont récemment proposé l'ajout des métaux comme information complémentaire aux isotopes stables dans l'utilisation d'un modèle de mélange bayésien. Cette approche, pour l'instant restreinte à l'étude de l'écologie de poissons d'eau douce s'alimentant sur une diversité limitée de sources, permet une meilleure estimation de la contribution de différentes proies dans le régime alimentaire des consommateurs, en tenant d'avantage compte de la variabilité inter et intraspécifique en termes de comportements alimentaires.

## 4. CONCLUSION

---

Les résultats obtenus au cours de cette thèse soulignent l'intérêt particulier de poursuivre les études dans le domaine de la répartition subcellulaire des métaux, ce paramètre déterminant à la fois leur accumulation et leur toxicité. D'autre part, cette distribution influence également le transfert trophique des métaux (Eyckmans et al., 2011; Rainbow et al., 2011). Même si certaines tendances ont pu être établies quant à l'assimilation des métaux liés à certaines fractions comme les protéines cytosoliques incluant les MT et des enzymes, la biodisponibilité trophique semble toutefois dépendre des organismes et du métal considéré. L'assimilation trophique du Cd ne varie ainsi pas en fonction de la répartition subcellulaire du métal dans les proies chez le choquemort *Fundulus heteroclitus* (Goto et Wallace, 2009) ni chez *Terapon jarbua* (Zhang et Wang, 2006b) contrairement à d'autres métaux. La distribution cellulaire du Cd dans les proies agit pourtant sur l'assimilation trophique du métal par la crevette *Palaemon macrodactylus* (Wallace et Luoma, 2003). Une détermination plus précise de l'assimilation de certaines

formes complexées des métaux est donc nécessaire à la meilleure compréhension du transfert des éléments au long des chaînes trophiques marines. Cette approche devrait de plus être davantage appliquée dans l'évaluation des risques sanitaires engendrés par la consommation de chair de poissons. En effet, alors que la répartition subcellulaire varie entre les espèces et détermine l'assimilation par l'Homme de nombreux métaux, dont certains toxiques tels que le cadmium et l'arsenic (He et al., 2010), ce paramètre n'est jusqu'à présent pas considéré dans l'élaboration des normes sanitaires.

En conclusion, l'ensemble des études menées durant cette thèse a permis de confirmer l'importance de différents paramètres dans la variabilité d'accumulation des métaux observée chez les poissons marins du courant des Canaries. A un premier niveau d'intégration, les caractéristiques physiologiques spécifiques telles que l'efficacité d'assimilation, les concentrations en métallothionéines et le mode de séquestration des métaux agissent sur la bioaccumulation. Ensuite, à un second niveau, la nature des proies joue un rôle crucial sur l'exposition aux métaux du fait de la dominance de la voie de transfert trophique chez les poissons marins. A un dernier niveau d'intégration, l'habitat représente un paramètre déterminant, principalement en influant sur les niveaux de contamination des proies soumis au cycle des métaux dans l'environnement marin. Ces travaux ont également mis en évidence l'importante variabilité intraspécifique observée dans l'expression des comportements alimentaires et l'occupation de l'habitat, trop souvent sous-estimée et conduisant pourtant à des différences d'accumulation entre individus d'une même espèce. Enfin, cette thèse a présenté une approche innovante, en proposant une étude intégrée de la cellule à l'écosystème en passant par l'individu, dédiée à la compréhension d'un mécanisme impliquant des répercussions tant sur la préservation des ressources marines que sur la santé des consommateurs.

# BIBLIOGRAPHIE





# A

---

- Ackerman, P.A., Morgan, J.D., Iwama, G.K., 2005. Les anésthésiques.
- Adam, V., Fabrik, I., Kizek, R., Adam, V., Eckschlager, T., Stiborova, M., Trnkova, L., 2010. Vertebrate metallothioneins as target molecules for analytical techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 29, 409–418. doi:10.1016/j.trac.2010.02.004
- Aldo Viarengo, R.F., Bruno Burlando, Francesco Dondero, Anna Marro, 1999. Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. *Biomarkers* 4, 455–466. doi:10.1080/135475099230615
- Almeida, J.A., Diniz, Y.S., Marques, S.F.G., Faine, L.A., Ribas, B.O., Burneiko, R.C., Novelli, E.L.B., 2002. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environment International* 27, 673–679. doi:10.1016/S0160-4120(01)00127-1
- Al-Yousuf, M.H., El-Shahawi, M.S., Al-Ghais, S.M., 2000. Trace metals in liver, skin and muscle of *Lethrinus lentjan* fish species in relation to body length and sex. *Science of The Total Environment* 256, 87–94. doi:10.1016/S0048-9697(99)00363-0
- Andréasson, M., Dave, G., 1995. Transfer of heavy metals from sediment to fish, and their biliary excretion. *Journal of Aquatic Ecosystem Health* 4, 221–230. doi:10.1007/BF00118002
- Araújo, C.V.M., Cedeño-Macias, L.A., 2016. Heavy metals in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) and common dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) landed on the Ecuadorian coast. *Science of The Total Environment* 541, 149–154. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.09.090
- Auger, P.A., Machu, E., Gorgues, T., Grima, N., Waeles, M., 2015. Comparative study of potential transfer of natural and anthropogenic cadmium to plankton communities in the North-West African upwelling. *Science of The Total Environment* 505, 870–888. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.10.045

# B

---

- Bai, J., Rodriguez, A.M., Melendez, J.A., Cederbaum, A.I., 1999. Overexpression of Catalase in Cytosolic or Mitochondrial Compartment Protects HepG2 Cells against Oxidative Injury. *J. Biol. Chem.* 274, 26217–26224. doi:10.1074/jbc.274.37.26217
- Baines, S.B., Fisher, N.S., Stewart, R., 2002. Assimilation and retention of selenium and other trace elements from crustacean food by juvenile striped bass (*Morone saxatilis*). *Limnol. Oceanogr.* 47, 646–655. doi:10.4319/lo.2002.47.3.0646
- Balcom, P.H., Schartup, A.T., Mason, R.P., Chen, C.Y., 2015. Sources of water column methylmercury across multiple estuaries in the Northeast U.S. *Marine Chemistry* 177, Part 5, 721–730. doi:10.1016/j.marchem.2015.10.012

- Baldisserotto, B., Chowdhury, M.J., Wood, C.M., 2005. Effects of dietary calcium and cadmium on cadmium accumulation, calcium and cadmium uptake from the water, and their interactions in juvenile rainbow trout. *Aquatic Toxicology, Mechanisms in Metal Toxicology* 72, 99–117. doi:10.1016/j.aquatox.2004.11.019
- Ballatori, N., 1991. Mechanisms of metal transport across liver cell plasma membranes. *Drug Metab. Rev.* 23, 83–132. doi:10.3109/03602539109029757
- Balter, V., Lamboux, A., Zazzo, A., Télouk, P., Leverrier, Y., Marvel, J., Moloney, A.P., Monahan, F.J., Schmidt, O., Albarède, F., 2013. Contrasting Cu, Fe, and Zn isotopic patterns in organs and body fluids of mice and sheep, with emphasis on cellular fractionation. *Metallomics* 5, 1470–1482. doi:10.1039/C3MT00151B
- Bank, M.S., Chesney, E., Shine, J.P., Maage, A., Senn, D.B., 2007. Mercury Bioaccumulation and Trophic Transfer in Sympatric Snapper Species from the Gulf of Mexico. *Ecological Applications* 17, 2100–2110. doi:10.1890/06-1422.1
- Barhoumi, S., MESSAOUDI, I., DELI, T., SAÏD, K., KERKENI, A., 2009. Cadmium bioaccumulation in three benthic fish species, *Salaria basilisca*, *Zosterisessor ophiocephalus* and *Solea vulgaris* collected from the Gulf of Gabes in Tunisia. *Journal of Environmental Sciences* 21, 980–984. doi:10.1016/S1001-0742(08)62371-2
- Barone, G., Giacomini-Stuffler, R., Storelli, M.M., 2013. Comparative study on trace metal accumulation in the liver of two fish species (Torpedinidae): Concentration–size relationship. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 97, 73–77. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.07.004
- Basha, P.S., Rani, A.U., 2003. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 218–221. doi:10.1016/S0147-6513(03)00028-9
- Beckmann, C.L., Mitchell, J.G., Stone, D.A.J., Huveneers, C., 2014. Inter-Tissue Differences in Fatty Acid Incorporation as a Result of Dietary Oil Manipulation in Port Jackson Sharks (*Heterodontus portusjacksoni*). *Lipids* 49, 577–590. doi:10.1007/s11745-014-3887-6
- Beckmann, C.L., Mitchell, J.G., Stone, D.A.J., Huveneers, C., 2013. A controlled feeding experiment investigating the effects of a dietary switch on muscle and liver fatty acid profiles in Port Jackson sharks *Heterodontus portusjacksoni*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 448, 10–18. doi:10.1016/j.jembe.2013.06.009
- Beg, M.U., Al-Jandal, N., Al-Subiai, S., Karam, Q., Husain, S., Butt, S.A., Ali, A., Al-Hasan, E., Al-Dufaleej, S., Al-Husaini, M., 2015. Metallothionein, oxidative stress and trace metals in gills and liver of demersal and pelagic fish species from Kuwait's marine area. *Marine Pollution Bulletin, An Ecological Assessment of Kuwait's Marine Environment* 100, 662–672. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.07.058
- Benbrahim, S., Chafik, A., Chfiri, R., Fatima, Z.B., Siefeddine, M., Makaoui, A., 2006. Etude des facteurs influençant la répartition géographique et temporelle de la contamination des côtes atlantiques marocaines par les métaux lourds: cas du mercure, du plomb et du cadmium. *Marine life* 16, 37–47.

- Bergquist, B.A., Blum, J.D., 2007. Mass-Dependent and -Independent Fractionation of Hg Isotopes by Photoreduction in Aquatic Systems. *Science* 318, 417–420. doi:10.1126/science.1148050
- Berntssen, M.H.G., Aspholm, O.Ø., Hylland, K., Wendelaar Bonga, S.E., Lundebye, A.-K., 2001. Tissue metallothionein, apoptosis and cell proliferation responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr fed elevated dietary cadmium. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 128, 299–310. doi:10.1016/S1532-0456(00)00204-0
- Bloom, N.S., 1992. On the Chemical Form of Mercury in Edible Fish and Marine Invertebrate Tissue. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49, 1010–1017. doi:10.1139/f92-113
- Bodin, N., Lesperance, D., Albert, R., Hollanda, S., Michaud, P., Degroote, M., Churlaud, C., Bustamante, P., 2017. Trace elements in oceanic pelagic communities in the western Indian Ocean. *Chemosphere* 174, 354–362. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.01.099
- Bodin, N., N’Gom-Kâ, R., Kâ, S., Thiaw, O.T., Tito de Morais, L., Le Loc’h, F., Rozuel-Chartier, E., Auger, D., Chiffolleau, J.-F., 2013. Assessment of trace metal contamination in mangrove ecosystems from Senegal, West Africa. *Chemosphere* 90, 150–157. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.06.019
- Bosch, A.C., O’Neill, B., Sigge, G.O., Kerwath, S.E., Hoffman, L.C., 2016. Heavy metals in marine fish meat and consumer health: a review. *J. Sci. Food Agric.* 96, 32–48. doi:10.1002/jsfa.7360
- Boutier, B., Chiffolleau, J.-F., Jouanneau, J.-M., Latouche, C., Philipps, I., 1989. La contamination de la Gironde par le cadmium : origine, extension, importance.
- Buchheister, A., Latour, R.J., 2010. Turnover and fractionation of carbon and nitrogen stable isotopes in tissues of a migratory coastal predator, summer flounder (*Paralichthys dentatus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 67, 445–461. doi:10.1139/F09-196
- Budge, S.M., Iverson, S.J., Bowen, W.D., Ackman, R.G., 2002. Among- and within-species variability in fatty acid signatures of marine fish and invertebrates on the Scotian Shelf, Georges Bank, and southern Gulf of St. Lawrence. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59, 886–898. doi:10.1139/f02-062

## C

---

- Campbell, P.G.C., Kraemer, L.D., Giguère, A., Hare, L., Hontela, A., 2008. Subcellular Distribution of Cadmium and Nickel in Chronically Exposed Wild Fish: Inferences Regarding Metal Detoxification Strategies and Implications for Setting Water Quality Guidelines for Dissolved Metals. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 14, 290–316. doi:10.1080/10807030801935009
- Canli, M., Atli, G., 2003. The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. *Environmental Pollution* 121, 129–136. doi:10.1016/S0269-7491(02)00194-X

- Capet, X., Estrade, P., Machu, E., Ndoye, S., Grelet, J., Lazar, A., Marié, L., Dausse, D., Brehmer, P., 2016. On the Dynamics of the Southern Senegal Upwelling Center: Observed Variability from Synoptic to Superinertial Scales. *J. Phys. Oceanogr.* 47, 155–180. doi:10.1175/JPO-D-15-0247.1
- Cattani, O., Serra, R., Isani, G., Raggi, G., Cortesi, P., Carpena, E., 1996. Correlation between metallothionein and energy metabolism in sea bass, *Dicentrarchus labrax*, exposed to cadmium. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 113, 193–199. doi:10.1016/0742-8413(95)02087-X
- Caverivière, A., 1993. Les peuplements ichtyologiques démersaux : écologie et biologie, in: Le Loeuff, P., Marchal, E., Amon Kothias, J.B. (Eds.), *Environnement et ressources aquatiques de Côte d'Ivoire : 1. Le milieu marin*. ORSTOM, Paris, pp. 271–320.
- Chahid, A., Hilali, M., Benlhachimi, A., Bouzid, T., 2014. Contents of cadmium, mercury and lead in fish from the Atlantic sea (Morocco) determined by atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry* 147, 357–360. doi:10.1016/j.foodchem.2013.10.008
- Chan, H.M., Zhu, L.F., Zhong, R., Grant, D., Goyer, R.A., Cherian, M.G., 1993. Nephrotoxicity in Rats Following Liver Transplantation from Cadmium-Exposed Rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 123, 89–96. doi:10.1006/taap.1993.1225
- Chavez, F.P., Messié, M., 2009. A comparison of Eastern Boundary Upwelling Ecosystems. *Progress in Oceanography, Eastern Boundary Upwelling Ecosystems: Integrative and Comparative Approaches: Integrative and comparative approaches*, 2-8 June 2008, Las Palmas, Gran Canaria, Spain Eastern Boundary Upwelling Ecosystems Symposium 83, 80–96. doi:10.1016/j.pocean.2009.07.032
- Cheggour, M., Langston, W.J., Chafik, A., Texier, H., Idrissi, H., Boumezzough, A., 1999. Phosphate industry discharges and their impact on metal contamination and intertidal macrobenthos: Jorf Lasfar and Safi coastlines (Morocco). *Toxicological & Environmental Chemistry* 70, 159–179.
- Cheung, A.P.L., Lam, T.H.-J., Chan, K.M., 2004. Regulation of *Tilapia* metallothionein gene expression by heavy metal ions. *Marine Environmental Research, Twelfth International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms* 58, 389–394. doi:10.1016/j.marenvres.2004.03.084
- Chiffolleau, J.F., Gonzalez, J.L., Miramand, P., Thouvenin, B., 1999. Le cadmium: comportement d'un contaminant métallique en estuaire, Programme scientifique Seine-Aval. IFREMER.
- Choe, K.-Y., Gill, G.A., 2003. Distribution of particulate, colloidal, and dissolved mercury in San Francisco Bay estuary. 2. Methyl mercury. *Limnol. Oceanogr.* 48, 1547–1556. doi:10.4319/lo.2003.48.4.1547
- Chouvelon, T., Spitz, J., Caurant, F., Mèndez-Fernandez, P., Autier, J., Lassus-Débat, A., Chappuis, A., Bustamante, P., 2012a. Enhanced bioaccumulation of mercury in deep-sea fauna from the Bay of Biscay (north-east Atlantic) in relation to trophic positions identified by analysis of carbon and nitrogen stable isotopes. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 65, 113–124. doi:10.1016/j.dsr.2012.02.010

- Chouvelon, T., Spitz, J., Caurant, F., Mèndez-Fernandez, P., Autier, J., Lassus-Débat, A., Chappuis, A., Bustamante, P., 2012b. Enhanced bioaccumulation of mercury in deep-sea fauna from the Bay of Biscay (north-east Atlantic) in relation to trophic positions identified by analysis of carbon and nitrogen stable isotopes. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 65, 113–124. doi:10.1016/j.dsr.2012.02.010
- Chowdhury, M., McDonald, D., Wood, C., 2004. Gastrointestinal uptake and fate of cadmium in rainbow trout acclimated to sublethal dietary cadmium. *Aquatic Toxicology* 69, 149–163. doi:10.1016/j.aquatox.2004.05.002
- Chowdhury, M.J., Baldisserotto, B., Wood, C.M., 2005. Tissue-Specific Cadmium and Metallothionein Levels in Rainbow Trout Chronically Acclimated to Waterborne or Dietary Cadmium. *Arch Environ Contam Toxicol* 48, 381–390. doi:10.1007/s00244-004-0068-2
- Chowdhury, M.J., Grosell, M., McDonald, D., Wood, C., 2003. Plasma clearance of cadmium and zinc in non-acclimated and metal-acclimated trout. *Aquatic Toxicology* 64, 259–275. doi:10.1016/S0166-445X(03)00074-2
- Choy, C.A., Popp, B.N., Kaneko, J.J., Drazen, J.C., 2009. The influence of depth on mercury levels in pelagic fishes and their prey. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 13865. doi:10.1073/pnas.0900711106
- Cloquet, C., Carignan, J., Libourel, G., Sterckeman, T., Perdrix, E., 2006. Tracing Source Pollution in Soils Using Cadmium and Lead Isotopes. *Environ. Sci. Technol.* 40, 2525–2530. doi:10.1021/es052232+
- Commission regulation (UE), 2014. amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of cadmium in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*.
- Condini, M.V., Hoeninghaus, D.J., Roberts, A.P., Soulen, B.K., Garcia, A.M., 2017. Mercury concentrations in dusky grouper *Epinephelus marginatus* in littoral and neritic habitats along the Southern Brazilian coast. *Marine Pollution Bulletin* 115, 266–272. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.12.006
- Cossa, D., Coquery, M., 2005. The Mediterranean Mercury Anomaly, a Geochemical or a Biological Issue 177–208. doi:10.1007/b107147
- Cossa, D., Coquery, M., Gobeil, C., Martin, J.-M., 1996. Mercury Fluxes at the Ocean Margins, in: Baeyens, W., Ebinghaus, R., Vasiliev, O. (Eds.), *Global and Regional Mercury Cycles: Sources, Fluxes and Mass Balances*, NATO ASI Series. Springer Netherlands, pp. 229–247. doi:10.1007/978-94-009-1780-4\_11
- Cossa, D., Durrieu de Madron, X., Schäfer, J., Lanceleur, L., Guédron, S., Buscail, R., Thomas, B., Castelle, S., Naudin, J.-J., 2017. The open sea as the main source of methylmercury in the water column of the Gulf of Lions (Northwestern Mediterranean margin). *Geochimica et Cosmochimica Acta* 199, 222–237. doi:10.1016/j.gca.2016.11.037
- Cossa, D., Harmelin-Vivien, M., Mellon-Duval, C., Loizeau, V., Averty, B., Crochet, S., Chou, L., Cadiou, J.-F., 2012. Influences of Bioavailability, Trophic Position, and Growth on Methylmercury in Hakes (*Merluccius merluccius*) from Northwestern Mediterranean and Northeastern Atlantic. *Environ. Sci. Technol.* 46, 4885–4893. doi:10.1021/es204269w

- Costa, P.M., Caeiro, S., Costa, M.H., 2012. Multi-organ histological observations on juvenile Senegalese soles exposed to low concentrations of waterborne cadmium. *Fish Physiol Biochem* 39, 143–158. doi:10.1007/s10695-012-9686-1
- Costalago, D., Navarro, J., Alvarez-Calleja, I., Palomera, I., 2012. Ontogenetic and seasonal changes in the feeding habits and trophic levels of two small pelagic fish species. *Marine Ecology Progress Series* 460, 169–181.
- Creighton, N., Twining, J., 2010a. Bioaccumulation from food and water of cadmium, selenium and zinc in an estuarine fish, *Ambassis jacksoniensis*. *Marine Pollution Bulletin* 60, 1815–1821. doi:10.1016/j.marpolbul.2010.05.025
- Creighton, N., Twining, J., 2010b. Bioaccumulation from food and water of cadmium, selenium and zinc in an estuarine fish, *Ambassis jacksoniensis*. *Marine Pollution Bulletin* 60, 1815–1821. doi:10.1016/j.marpolbul.2010.05.025
- Cresson, P., Fabri, M.C., Bouchoucha, M., Brach Papa, C., Chavanon, F., Jadaud, A., Knoery, J., Miralles, F., Cossa, D., 2014. Mercury in organisms from the Northwestern Mediterranean slope: Importance of food sources. *Science of The Total Environment* 497–498, 229–238. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.07.069
- Cretì, P., Trinchella, F., Scudiero, R., 2009. Heavy metal bioaccumulation and metallothionein content in tissues of the sea bream *Sparus aurata* from three different fish farming systems. *Environ Monit Assess* 165, 321–329. doi:10.1007/s10661-009-0948-z

## D

---

- Dallinger, R., Egg, M., Köck, G., Hofer, R., 1997. The role of metallothionein in cadmium accumulation of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) from high alpine lakes. *Aquatic Toxicology* 38, 47–66. doi:10.1016/S0166-445X(96)00840-5
- Dalsgaard, J., St. John, M., Kattner, G., Müller-Navarra, D., Hagen, W., 2003. Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment, in: *Biology, B.-A. in M. (Ed.)*, . Academic Press, pp. 225–340.
- Dang, F., Wang, W.-X., 2009. Assessment of tissue-specific accumulation and effects of cadmium in a marine fish fed contaminated commercially produced diet. *Aquatic Toxicology* 95, 248–255. doi:10.1016/j.aquatox.2009.09.013
- Danion, M., Le Floch, S., Kanan, R., Lamour, F., Quentel, C., 2011. Effects of in vivo chronic hydrocarbons pollution on sanitary status and immune system in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquatic Toxicology* 105, 300–311. doi:10.1016/j.aquatox.2011.06.022
- Darnaude, A.M., 2005. Fish ecology and terrestrial carbon use in coastal areas: implications for marine fish production. *Journal of Animal Ecology* 74, 864–876. doi:10.1111/j.1365-2656.2005.00978.x
- Das, K., Lepoint, G., Loizeau, V., Debacker, V., Dauby, P., Bouqueneau, J.M., 2000. Tuna and Dolphin Associations in the North-east Atlantic: Evidence of Different Ecological Niches

- from Stable Isotope and Heavy Metal Measurements. *Marine Pollution Bulletin* 40, 102–109. doi:10.1016/S0025-326X(99)00178-2
- De Lisle, R.C., Sarras, M.P., Hidalgo, J., Andrews, G.K., 1996. Metallothionein is a component of exocrine pancreas secretion: implications for zinc homeostasis. *Am. J. Physiol.* 271, C1103–1110.
- DeNiro, M.J., Epstein, S., 1977. Mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis. *Science* 197, 261–263.
- Diop, C., Dewaelé, D., Cazier, F., Diouf, A., Ouddane, B., 2015. Assessment of trace metals contamination level, bioavailability and toxicity in sediments from Dakar coast and Saint Louis estuary in Senegal, West Africa. *Chemosphere*. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.12.041
- Diop, C., Dewaelé, D., Diop, M., Touré, A., Cabral, M., Cazier, F., Fall, M., Diouf, A., Ouddane, B., 2014. Assessment of contamination, distribution and chemical speciation of trace metals in water column in the Dakar coast and the Saint Louis estuary from Senegal, West Africa. *Marine Pollution Bulletin*. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.06.051
- Diop, C., Dewaele, D., Toure, A., Cabral, M., Cazier, F., Fall, M., Ouddane, B., Diouf, A., 2012. Étude de la contamination par les éléments traces métalliques des sédiments cotiers au niveau des points d'évacuation des eaux usées à Dakar (Sénégal). *Revue des sciences de l'eau* 25, 277. doi:10.7202/1013107ar
- Diop, M., Amara, R., 2016. Mercury concentrations in the coastal marine food web along the Senegalese coast. *Environ Sci Pollut Res* 23, 11975–11984. doi:10.1007/s11356-016-6386-x
- Diop, M., Howsam, M., Diop, C., Cazier, F., Goossens, J.F., Diouf, A., Amara, R., 2016a. Spatial and seasonal variations of trace elements concentrations in liver and muscle of round Sardinelle (*Sardinella aurita*) and Senegalese sole (*Solea senegalensis*) along the Senegalese coast. *Chemosphere* 144, 758–766. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.08.085
- Diop, M., Howsam, M., Diop, C., Goossens, J.F., Diouf, A., Amara, R., 2016b. Assessment of trace element contamination and bioaccumulation in algae (*Ulva lactuca*), mussels (*Perna perna*), shrimp (*Penaeus kerathurus*), and fish (*Mugil cephalus*, *Saratherondon melanotheron*) along the Senegalese coast. *Marine Pollution Bulletin* 103, 339–343. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.12.038
- Diouf, P.S., 1996. Les peuplements de poissons des milieux estuariens de l'Afrique de l'Ouest : l'exemple de l'estuaire hyperhalin du Sine-Saloum. ORSTOM, Paris.
- Domi, N., Bouquegneau, J.M., Das, K., 2005. Feeding ecology of five commercial shark species of the Celtic Sea through stable isotope and trace metal analysis. *Marine Environmental Research* 60, 551–569. doi:10.1016/j.marenvres.2005.03.001
- Driscoll, C.T., Mason, R.P., Chan, H.M., Jacob, D.J., Pirrone, N., 2013. Mercury as a Global Pollutant: Sources, Pathways, and Effects. *Environ. Sci. Technol.* 47, 4967–4983. doi:10.1021/es305071v



## E

---

- El Morhit, M., Belghity, D., El Morhit, A., 2013. Metallic contamination in muscle of three fish species in the southern Atlantic coast at Laayoune (Morocco). *LARHYSS Journal* ISSN 1112-3680.
- Endo, T., Hisamichi, Y., Haraguchi, K., Kato, Y., Ohta, C., Koga, N., 2008. Hg, Zn and Cu levels in the muscle and liver of tiger sharks (*Galeocerdo cuvier*) from the coast of Ishigaki Island, Japan: Relationship between metal concentrations and body length. *Marine Pollution Bulletin* 56, 1774–1780. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.06.003
- Eyckmans, M., Blust, R., De Boeck, G., 2012. Subcellular differences in handling Cu excess in three freshwater fish species contributes greatly to their differences in sensitivity to Cu. *Aquatic Toxicology* 118–119, 97–107. doi:10.1016/j.aquatox.2012.03.019
- Eyckmans, M., Celis, N., Horemans, N., Blust, R., De Boeck, G., 2011. Exposure to waterborne copper reveals differences in oxidative stress response in three freshwater fish species. *Aquatic Toxicology* 103, 112–120. doi:10.1016/j.aquatox.2011.02.010

## F

---

- Fan, W., Xu, Z., Wang, W.-X., 2015. Contrasting metal detoxification in polychaetes, bivalves and fish from a contaminated bay. *Aquatic Toxicology* 159, 62–68. doi:10.1016/j.aquatox.2014.11.024
- FAO. Report of the FAO Working Group on the Assessment of Small Pelagic Fish off Northwest Africa. *FAO Fisheries Report*, Banjul, Gambia, pp. 2e11, 811, 192 pp., 2006.
- Farias, I., Figueiredo, I., Janeiro, A.I., Bandarra, N.M., Batista, I., Morales-Nin, B., 2014. Reproductive and feeding spatial dynamics of the black scabbardfish, *Aphanopus carbo* Lowe, 1839, in NE Atlantic inferred from fatty acid and stable isotope analyses. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 89, 84–93. doi:10.1016/j.dsr.2014.04.010
- Faucher, K., Fichet, D., Miramand, P., Lagardère, J.-P., 2008. Impact of chronic cadmium exposure at environmental dose on escape behaviour in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.; Teleostei, Moronidae). *Environmental Pollution* 151, 148–157. doi:10.1016/j.envpol.2007.02.017
- Faye, D., Tito de Morais, L., Raffray, J., Sadio, O., Thiaw, O.T., Le Loc'h, F., 2011. Structure and seasonal variability of fish food webs in an estuarine tropical marine protected area (Senegal): Evidence from stable isotope analysis. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 92, 607–617. doi:10.1016/j.ecss.2011.02.017
- Fernandes, D., Bebianno, M.J., Porte, C., 2008. Hepatic levels of metal and metallothioneins in two commercial fish species of the Northern Iberian shelf. *Science of The Total Environment* 391, 159–167. doi:10.1016/j.scitotenv.2007.10.057

- Fernandes, D., Porte, C., Bebianno, M.J., 2007. Chemical residues and biochemical responses in wild and cultured European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Environmental Research* 103, 247–256. doi:10.1016/j.envres.2006.05.015
- Fitzgerald, W.F., Lamborg, C.H., Hammerschmidt, C.R., 2007. Marine biogeochemical cycling of mercury. *Chem. Rev.* 107, 641–662. doi:10.1021/cr050353m
- Fonseca, V.F., França, S., Serafim, A., Company, R., Lopes, B., Bebianno, M.J., Cabral, H.N., 2011. Multi-biomarker responses to estuarine habitat contamination in three fish species: *Dicentrarchus labrax*, *Solea senegalensis* and *Pomatoschistus microps*. *Aquatic Toxicology* 102, 216–227. doi:10.1016/j.aquatox.2011.01.018
- Fréon, P., Barange, M., Arístegui, J., 2009. Eastern Boundary Upwelling Ecosystems: Integrative and comparative approaches. *Progress in Oceanography, Eastern Boundary Upwelling Ecosystems: Integrative and Comparative Approaches: Integrative and comparative approaches*, 2-8 June 2008, Las Palmas, Gran Canaria, Spain Eastern Boundary Upwelling Ecosystems Symposium 83, 1–14. doi:10.1016/j.pocean.2009.08.001
- Friberg, L., Elinder, C., Kjellstrom, T., Nordberg, G.F., 1985. Cadmium and health: A toxicological and epidemiological appraisal Volume 1: Exposure, dose, and metabolism.
- Froese, R., Pauly, D., 2017. FishBase [WWW Document]. World Wide Web electronic publication Web electronic publication. www.fishbase.org. URL <http://www.fishbase.org/search.php> (accessed 4.11.17).
- Fry, B., 2007. *Stable Isotope Ecology*. Springer Science & Business Media.
- Fry, B., 1988. Food web structure on Georges Bank from stable C, N, and S isotopic compositions. *Limnol. Oceanogr.* 33, 1182–1190. doi:10.4319/lo.1988.33.5.1182
- Fry, B., Sherr, E.B., 1989.  $\delta^{13}\text{C}$  Measurements as Indicators of Carbon Flow in Marine and Freshwater Ecosystems. *SpringerLink* 196–229. doi:10.1007/978-1-4612-3498-2\_12
- Fu, H., Steinebach, O.M., van den Hamer, C.J.A., Balm, P.H.M., Lock, R.A.C., 1990. Involvement of cortisol and metallothionein-like proteins in the physiological responses of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to sublethal cadmium stress. *Aquatic Toxicology* 16, 257–269. doi:10.1016/0166-445X(90)90040-V

## G

---

- Gaudry, A., Zeroual, S., Gaie-Levrel, F., Moskura, M., Boujrhaj, F.Z., El Moursli, R.C., Guessous, A., Mouradi, A., Givernaud, T., Delmas, R., 2007. Heavy Metals Pollution of the Atlantic Marine Environment by the Moroccan Phosphate Industry, as Observed through their Bioaccumulation in *Ulva Lactuca*. *Water, Air, & Soil Pollution* 178, 267–285.
- Gehrke, G.E., Blum, J.D., Slotton, D.G., Greenfield, B.K., 2011. Mercury Isotopes Link Mercury in San Francisco Bay Forage Fish to Surface Sediments. *Environ. Sci. Technol.* 45, 1264–1270. doi:10.1021/es103053y

- George, S.G., Pirie, B.J.S., Coombs, T.L., 1980. Isolation and elemental analysis of metal-rich granules from the kidney of the scallop, *Pecten maximus* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 42, 143–156. doi:10.1016/0022-0981(80)90172-0
- George, S.G., Todd, K., Wright, J., 1996. Regulation of metallothionein in teleosts: Induction of MTmRNA and protein by cadmium in hepatic and extrahepatic tissues of a marine flatfish, the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 113, 109–115. doi:10.1016/0742-8413(95)02076-4
- Giari, L., Manera, M., Simoni, E., Dezfuli, B.S., 2007. Cellular alterations in different organs of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) exposed to cadmium. *Chemosphere* 67, 1171–1181. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.10.061
- Giguère, A., Campbell, P., Hare, L., Couture, P., 2006. Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) sampled along a polymetallic gradient ☆. *Aquatic Toxicology* 77, 178–189. doi:10.1016/j.aquatox.2005.12.001
- Giguère, A., Campbell, P.G.C., Hare, L., Couture, P., 2006. Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) sampled along a polymetallic gradient. *Aquatic Toxicology* 77, 178–189. doi:10.1016/j.aquatox.2005.12.001
- Glynn, A.W., 1991. Cadmium and Zinc Kinetics in Fish: Studies on Water-Borne <sup>109</sup>Cd and <sup>65</sup>Zn Turnover and Intracellular Distribution in Minnows, *Phoxinus phoxinus*. *Pharmacology & Toxicology* 68, 485–491. doi:10.1111/j.1600-0773.1991.tb01274.x
- Görlach, A., Klappa, P., Kietzmann, D.T., 2006. The Endoplasmic Reticulum: Folding, Calcium Homeostasis, Signaling, and Redox Control. *Antioxidants & Redox Signaling* 8, 1391–1418. doi:10.1089/ars.2006.8.1391
- Goto, D., Wallace, W.G., 2009. Influences of prey- and predator-dependent processes on cadmium and methylmercury trophic transfer to mummichogs (*Fundulus heteroclitus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 66, 836–846. doi:10.1139/F09-038
- Goutte, A., Cherel, Y., Churlaud, C., Ponthus, J.-P., Massé, G., Bustamante, P., 2015. Trace elements in Antarctic fish species and the influence of foraging habitats and dietary habits on mercury levels. *Science of The Total Environment* 538, 743–749. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.08.103
- Guinot, D., Ureña, R., Pastor, A., Varó, I., Ramo, J. del, Torreblanca, A., 2012. Long-term effect of temperature on bioaccumulation of dietary metals and metallothionein induction in *Sparus aurata*. *Chemosphere* 87, 1215–1221. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.01.020
- Guo, F., Yao, J., Wang, W.-X., 2013. Bioavailability of purified subcellular metals to a marine fish. *Environ Toxicol Chem* 32, 2109–2116. doi:10.1002/etc.2286

# H

---

- Hakima, Z., Mohamed, M., Aziza, M., Mehdi, M., Meryem, E.B., Bendahhou, Z., Jean-Francois, B., 2017. Environmental and ecological risk of heavy metals in the marine sediment from Dakhla Bay, Morocco. *Environ Sci Pollut Res* 24, 7970–7981. doi:10.1007/s11356-017-8367-0
- Hammerschmidt, C.R., Fitzgerald, W.F., 2006. Methylmercury cycling in sediments on the continental shelf of southern New England. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70, 918–930. doi:10.1016/j.gca.2005.10.020
- Harada, M., 1995. Minamata Disease: Methylmercury Poisoning in Japan Caused by Environmental Pollution. *Critical Reviews in Toxicology* 25, 1–24. doi:10.3109/10408449509089885
- Hauser-Davis, R.A., Bastos, F.F., de Oliveira, T.F., Ziolli, R.L., de Campos, R.C., 2012a. Fish bile as a biomarker for metal exposure. *Marine Pollution Bulletin* 64, 1589–1595. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.05.017
- Hauser-Davis, R.A., Bastos, F.F., Tuton, B., Chávez Rocha, R., Pierre, T.S., Ziolli, R.L., Arruda, M.A.Z., 2014a. Bile and liver metallothionein behavior in copper-exposed fish. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 28, 70–74. doi:10.1016/j.jtemb.2013.09.003
- Hauser-Davis, R.A., Bastos, F.F., Tuton, B., Chávez Rocha, R., Pierre, T.S., Ziolli, R.L., Arruda, M.A.Z., 2014b. Bile and liver metallothionein behavior in copper-exposed fish. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 28, 70–74. doi:10.1016/j.jtemb.2013.09.003
- Hauser-Davis, R.A., Campos, R.C. de, Ziolli, R.L., 2012b. Fish Metalloproteins as Biomarkers of Environmental Contamination, in: Whitacre, D.M. (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 218*, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Springer US, pp. 101–123. doi:10.1007/978-1-4614-3137-4\_2
- Hauser-Davis, R.A., Gonçalves, R.A., Ziolli, R.L., Campos, R.C. de, 2012c. A novel report of metallothioneins in fish bile: SDS-PAGE analysis, spectrophotometry quantification and metal speciation characterization by liquid chromatography coupled to ICP-MS. *Aquatic Toxicology* 116–117, 54–60. doi:10.1016/j.aquatox.2012.03.003
- Hauser-Davis, R.A., Silva, J.A.N., Rocha, R.C.C., Saint’Pierre, T., Ziolli, R.L., Arruda, M.A.Z., 2016. Acute selenium selenite exposure effects on oxidative stress biomarkers and essential metals and trace-elements in the model organism zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 33, 68–72. doi:10.1016/j.jtemb.2015.09.001
- Haux, C., Larsson, Å., 1984. Long-term sublethal physiological effects on rainbow trout, *Salmo gairdneri*, during exposure to cadmium and after subsequent recovery. *Aquatic Toxicology* 5, 129–142. doi:10.1016/0166-445X(84)90004-3
- He, M., Ke, C.-H., Wang, W.-X., 2010. Effects of Cooking and Subcellular Distribution on the Bioaccessibility of Trace Elements in Two Marine Fish Species. *J. Agric. Food Chem.* 58, 3517–3523. doi:10.1021/jf100227n
- Hogstrand, C., Grosell, M., Wood, C.M., Hansen, H., 2003. Internal redistribution of radiolabelled silver among tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and European eel (*Anguilla*

anguilla): the influence of silver speciation. *Aquatic Toxicology* 63, 139–157. doi:10.1016/S0166-445X(02)00174-1

Hogstrand, C., Haux, C., 1991. Binding and detoxification of heavy metals in lower vertebrates with reference to metallothionein. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 100, 137–141. doi:10.1016/0742-8413(91)90140-O

Hogstrand, C., Lithner, G., Haux, C., 1991. The Importance of Metallothionein for the Accumulation of Copper, Zinc and Cadmium in Environmentally Exposed Perch, *Perca fluviatilis*\*. *Pharmacology & Toxicology* 68, 492–501. doi:10.1111/j.1600-0773.1991.tb01275.x

Hollis, L., Burnison, K., Playle, R.C., 1996. Does the age of metal-dissolved organic carbon complexes influence binding of metals to fish gills? *Aquatic Toxicology* 35, 253–264. doi:10.1016/0166-445X(96)00793-X

Horner, T.J., Lee, R.B.Y., Henderson, G.M., Rickaby, R.E.M., 2013. Nonspecific uptake and homeostasis drive the oceanic cadmium cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 2500–2505. doi:10.1073/pnas.1213857110

Hussey, N.E., MacNeil, M.A., Siple, M.C., Popp, B.N., Dudley, S.F.J., Fisk, A.T., 2015. Expanded trophic complexity among large sharks. *Food Webs* 4, 1–7. doi:10.1016/j.fooweb.2015.04.002

Hylland, K., Nissen-Lie, T., Christensen, P.G., Sandvik, M., 1998. Natural modulation of hepatic metallothionein and cytochrome P4501A in flounder, *Platichthys flesus* L. *Marine Environmental Research, Pollutant Responses in Marine Organisms* 46, 51–55. doi:10.1016/S0141-1136(97)00059-7

Hyllner, S.J., Andersson, T., Haux, C., Olsson, P.-E., 1989. Cortisol induction of metallothionein in primary culture of rainbow trout hepatocytes. *J. Cell. Physiol.* 139, 24–28. doi:10.1002/jcp.1041390105

## I

---

Inaba, T., Kobayashi, E., Suwazono, Y., Uetani, M., Oishi, M., Nakagawa, H., Nogawa, K., 2005. Estimation of cumulative cadmium intake causing Itai-itai disease. *Toxicology Letters* 159, 192–201. doi:10.1016/j.toxlet.2005.05.011

Interwies, E., Görlitz, S., 2013. Economic and Social Valuation of the CCLME Ecosystem Services. Rapport au Groupe de travail socioéconomie et commerce du CCLME. 50.

## J

---

Jackson, A.L., Inger, R., Parnell, A.C., Bearhop, S., 2011. Comparing isotopic niche widths among and within communities: SIBER – Stable Isotope Bayesian Ellipses in R. *Journal of Animal Ecology* 80, 595–602. doi:10.1111/j.1365-2656.2011.01806.x

- Janz, D.M., 2011. 7 - Selenium, in: Chris M. Wood, A.P.F. and C.J.B. (Ed.), *Fish Physiology, Homeostasis and Toxicology of Essential Metals*. Academic Press, pp. 327–374. doi:10.1016/S1546-5098(11)31007-2
- Jaouen, K., Szpak, P., Richards, M.P., 2016. Zinc Isotope Ratios as Indicators of Diet and Trophic Level in Arctic Marine Mammals. *PLOS ONE* 11, e0152299. doi:10.1371/journal.pone.0152299
- Jebali, J., Banni, M., Gerbej, H., Boussetta, H., López-Barea, J., Alhama, J., 2008a. Metallothionein induction by Cu, Cd and Hg in *Dicentrarchus labrax* liver: Assessment by RP-HPLC with fluorescence detection and spectrophotometry. *Marine Environmental Research* 65, 358–363. doi:10.1016/j.marenvres.2008.01.002
- Jebali, J., Banni, M., Gerbej, H., Boussetta, H., López-Barea, J., Alhama, J., 2008b. Metallothionein induction by Cu, Cd and Hg in *Dicentrarchus labrax* liver: Assessment by RP-HPLC with fluorescence detection and spectrophotometry. *Marine Environmental Research* 65, 358–363. doi:10.1016/j.marenvres.2008.01.002
- JECFA (FAO/OMS), 2007. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants, WHO Food Additive Series no. 58. World Health Organization, Geneva.
- Jeffree, R.A., Warnau, M., Teyssié, J.-L., Markich, S.J., 2006. Comparison of the bioaccumulation from seawater and depuration of heavy metals and radionuclides in the spotted dogfish *Scylliorhinus canicula* (Chondrichthys) and the turbot *Psetta maxima* (Actinopterygii: Teleostei). *Science of The Total Environment* 368, 839–852. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.03.026

## K

---

- Kaimoussi, A., Chafik, A., Mouzdahir, A., Bakkas, S., 2001. The impact of industrial pollution on the Jorf Lasfar coastal zone (Morocco, Atlantic Ocean): the mussel as an indicator of metal contamination. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IIA - Earth and Planetary Science* 333, 337–341. doi:10.1016/S1251-8050(01)01647-0
- Kalman, J., Riba, I., Ángel DelValls, T., Blasco, J., 2010. Comparative toxicity of cadmium in the commercial fish species *Sparus aurata* and *Solea senegalensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 306–311. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.10.013
- Kamunde, C., MacPhail, R., 2011a. Subcellular interactions of dietary cadmium, copper and zinc in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 105, 518–527. doi:10.1016/j.aquatox.2011.08.005
- Kamunde, C., MacPhail, R., 2011b. Metal-metal interactions of dietary cadmium, copper and zinc in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 658–667. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.10.016
- Kelly, J.R., Scheibling, R.E., 2012. Fatty acids as dietary tracers in benthic food webs. *Mar Ecol Prog Ser* 446, 1–22. doi:10.3354/meps09559

- Khan, M.A.K., Wang, F., 2009. Mercury-selenium compounds and their toxicological significance: Toward a molecular understanding of the mercury-selenium antagonism. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 1567–1577. doi:10.1897/08-375.1
- Kim, S.G., Eom, K.-H., Kim, S.-S., Jin, H.-G., Kang, J.-C., 2006. Kinetics of Cd accumulation and elimination in tissues of juvenile rockfish (*Sebastes schlegeli*) exposed to dietary Cd. *Marine Environmental Research* 62, 327–340. doi:10.1016/j.marenvres.2006.05.001
- Kim, S.-G., Jee, J.-H., Kang, J.-C., 2004. Cadmium accumulation and elimination in tissues of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* after sub-chronic cadmium exposure. *Environmental Pollution* 127, 117–123. doi:10.1016/S0269-7491(03)00254-9
- Kiszka, J.J., Aubail, A., Hussey, N.E., Heithaus, M.R., Caurant, F., Bustamante, P., 2015. Plasticity of trophic interactions among sharks from the oceanic south-western Indian Ocean revealed by stable isotope and mercury analyses. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 96, 49–58. doi:10.1016/j.dsr.2014.11.006
- Klaassen, C.D., 1978. Effect of metallothionein on hepatic disposition of metals. *Am. J. Physiol.* 234, E47-53.
- Klaassen, C.D., Liu, J., Diwan, B.A., 2009. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology, New Insights into the Mechanisms of Cadmium Toxicity* *Advances in Cadmium Research* 238, 215–220. doi:10.1016/j.taap.2009.03.026
- Kojadinovic, J., Potier, M., Le Corre, M., Cosson, R.P., Bustamante, P., 2007. Bioaccumulation of trace elements in pelagic fish from the Western Indian Ocean. *Environmental Pollution, Lichens in a Changing Pollution Environment* 146, 548–566. doi:10.1016/j.envpol.2006.07.015
- Koussoroplis, A., Bec, A., Perga, M., Koutrakis, E., Desvillettes, C., Bourdier, G., 2010. Nutritional importance of minor dietary sources for leaping grey mullet *Liza saliens* (Mugilidae) during settlement: insights from fatty acid  $\delta^{13}\text{C}$  analysis. *Marine Ecology Progress Series* 404, 207–217. doi:10.3354/meps08485
- Kwon, S.Y., Blum, J.D., Carvan, M.J., Basu, N., Head, J.A., Madenjian, C.P., David, S.R., 2012. Absence of fractionation of mercury isotopes during trophic transfer of methylmercury to freshwater fish in captivity. *Environmental science & technology* 46, 7527. doi:10.1021/es300794q
- Kwon, S.Y., Blum, J.D., Chirby, M.A., Chesney, E.J., 2013. Application of mercury isotopes for tracing trophic transfer and internal distribution of mercury in marine fish feeding experiments. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 2322–2330. doi:10.1002/etc.2313
- Kwon, S.Y., Blum, J.D., Madigan, D.J., Block, B.A., Popp, B.N., 2016. Quantifying mercury isotope dynamics in captive Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Elem Sci Anth* 4. doi:10.12952/journal.elementa.000088
- Kwong, R.W.M., Andrés, J.A., Niyogi, S., 2010. Molecular evidence and physiological characterization of iron absorption in isolated enterocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Implications for dietary cadmium and lead absorption. *Aquatic Toxicology* 99, 343–350. doi:10.1016/j.aquatox.2010.05.012

# L

---

- Lahaye, V., Bustamante, P., Spitz, J., Dabin, W., Das, K., Pierce, G.J., Caurant, F., 2005. Long-term dietary segregation of common dolphins *Delphinus delphis* in the Bay of Biscay, determined using cadmium as an ecological tracer. *Mar Ecol Prog Ser* 305, 275–285. doi:10.3354/meps305275
- Lapointe, D., Gentès, S., Ponton, D.E., Hare, L., Couture, P., 2009a. Influence of Prey Type on Nickel and Thallium Assimilation, Subcellular Distribution and Effects in Juvenile Fathead Minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Sci. Technol.* 43, 8665–8670. doi:10.1021/es901929m
- Lapointe, D., Gentès, S., Ponton, D.E., Hare, L., Couture, P., 2009b. Influence of prey type on nickel and thallium assimilation, subcellular distribution and effects in juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Sci. Technol.* 43, 8665–8670. doi:10.1021/es901929m
- Layman, C.A., Araujo, M.S., Boucek, R., Hammerschlag-Peyer, C.M., Harrison, E., Jud, Z.R., Match, P., Rosenblatt, A.E., Vaudo, J.J., Yeager, L.A., Post, D.M., Bearhop, S., 2012. Applying stable isotopes to examine food-web structure: an overview of analytical tools. *Biological Reviews* 87, 545–562. doi:10.1111/j.1469-185X.2011.00208.x
- Le Croizier, G., 2017 (Submitted). Significance of metallothioneins in differential metal accumulation kinetic between two marine fish species. *Environmental Pollution*.
- Le Croizier, G., Schaal, G., Gallon, R., Fall, M., Le Grand, F., Munaron, J.-M., Rouget, M.-L., Machu, E., Le Loc'h, F., Laë, R., De Morais, L.T., 2016a. Trophic ecology influence on metal bioaccumulation in marine fish: Inference from stable isotope and fatty acid analyses. *Science of The Total Environment* 573, 83–95. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.08.035
- Lehnerr, I., Louis, V.L.S., Hintelmann, H., Kirk, J.L., 2011. Methylation of inorganic mercury in polar marine waters. *Nature Geosci* 4, 298–302. doi:10.1038/ngeo1134
- Leonard, E.M., Banerjee, U., D'Silva, J.J., Wood, C.M., 2014. Chronic nickel bioaccumulation and sub-cellular fractionation in two freshwater teleosts, the round goby and the rainbow trout, exposed simultaneously to waterborne and dietborne nickel. *Aquatic Toxicology* 154, 141–153. doi:10.1016/j.aquatox.2014.04.028
- Li, M., Schartup, A.T., Valberg, A.P., Ewald, J.D., Krabbenhoft, D.P., Yin, R., Balcom, P.H., Sunderland, E.M., 2016. Environmental Origins of Methylmercury Accumulated in Subarctic Estuarine Fish Indicated by Mercury Stable Isotopes. *Environ. Sci. Technol.* 50, 11559–11568. doi:10.1021/acs.est.6b03206
- Lionetto, M. g., Giordano, M. e., Caricato, R., Pascariello, M. f., Marinosci, L., Schettino, T., 2001. Biomonitoring of heavy metal contamination along the Salento coast (Italy) by metallothionein evaluation in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus*. *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.* 11, 305–310. doi:10.1002/aqc.458
- Long, A., Wang, W., 2005a. Metallothionein induction and bioaccumulation kinetics of Cd and Ag in the marine fish *Terapon jarbua* challenged with dietary or waterborne Ag and Cu. *Mar Ecol Prog Ser* 291, 215–226. doi:10.3354/meps291215



Long, A., Wang, W.-X., 2005b. Assimilation and bioconcentration of Ag and Cd by the marine black bream after waterborne and dietary metal exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 709–716. doi:10.1897/03-664.1

López, R., De Pontual, H., Bertignac, M., Mahévas, S., 2015. What can exploratory modelling tell us about the ecobiology of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): a comprehensive overview. *Aquatic Living Resources*.

## M

---

Maanan, M., 2008. Heavy metal concentrations in marine molluscs from the Moroccan coastal region. *Environmental Pollution* 153, 176–183. doi:10.1016/j.envpol.2007.07.024

Maret, W., 2011. Metals on the move: zinc ions in cellular regulation and in the coordination dynamics of zinc proteins. *Biometals* 24, 411–418. doi:10.1007/s10534-010-9406-1

Mart, L., Nürnberg, H.W., 1986. The distribution of cadmium in the sea 28–40. doi:10.1007/978-3-0348-7238-6\_5

Martelli, A., Rousselet, E., Dycke, C., Bouron, A., Moulis, J.-M., 2006. Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. *Biochimie, Facets of Environmental Nuclear Toxicology* 88, 1807–1814. doi:10.1016/j.biochi.2006.05.013

Martínez-Álvarez, R.M., Morales, A.E., Sanz, A., 2005. Antioxidant Defenses in Fish: Biotic and Abiotic Factors. *Rev Fish Biol Fisheries* 15, 75–88. doi:10.1007/s11160-005-7846-4

Martinková, E., Chrastný, V., Francová, M., Šípková, A., Čuřík, J., Myška, O., Mižič, L., 2016. Cadmium isotope fractionation of materials derived from various industrial processes. *Journal of Hazardous Materials* 302, 114–119. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.09.039

Masbou, J., Point, D., Guillou, G., Sonke, J.E., Lebreton, B., Richard, P., 2015. Carbon Stable Isotope Analysis of Methylmercury Toxin in Biological Materials by Gas Chromatography Isotope Ratio Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 87, 11732–11738. doi:10.1021/acs.analchem.5b02918

Mason, R.P., Reinfelder, J.R., Morel, F.M.M., 1996. Uptake, Toxicity, and Trophic Transfer of Mercury in a Coastal Diatom. *Environ. Sci. Technol.* 30, 1835–1845. doi:10.1021/es950373d

Mathews, T., Fisher, N., Jeffree, R., Teyssié, J., 2008. Assimilation and retention of metals in teleost and elasmobranch fishes following dietary exposure. *Marine Ecology Progress Series* 360, 1–12. doi:10.3354/meps07462

Mathews, T., Fisher, N.S., 2009a. Dominance of dietary intake of metals in marine elasmobranch and teleost fish. *Science of The Total Environment* 407, 5156–5161. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.06.003

Mathews, T., Fisher, N.S., 2009b. Dominance of dietary intake of metals in marine elasmobranch and teleost fish. *Science of The Total Environment* 407, 5156–5161. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.06.003

- Mathews, T., Fisher, N.S., 2008. Trophic transfer of seven trace metals in a four-step marine food chain. *Mar Ecol Prog Ser* 367, 23–33. doi:10.3354/meps07536
- Mathews, and, Fisher, N.S., Jeffree, R.A., Teyssi, J., 2008. Assimilation and retention of metals in teleost and elasmobranch fishes following dietary exposure. *Mar Ecol Prog Ser* 360, 1–12. doi:10.3354/meps07462
- McClelland, J.W., Valiela, I., 1998. Linking nitrogen in estuarine producers to land-derived sources. *Limnol. Oceanogr.* 43, 577–585. doi:10.4319/lo.1998.43.4.0577
- McGeer, J.C., Niyogi, S., Scott Smith, D., 2011a. 3 - Cadmium, in: Chris M. Wood, A.P.F. and C.J.B. (Ed.), *Fish Physiology, Homeostasis and Toxicology of Non-Essential Metals*. Academic Press, pp. 125–184. doi:10.1016/S1546-5098(11)31025-4
- McGeer, J.C., Niyogi, S., Scott Smith, D., 2011b. 3 - Cadmium, in: Chris M. Wood, A.P.F. and C.J.B. (Ed.), *Fish Physiology, Homeostasis and Toxicology of Non-Essential Metals*. Academic Press, pp. 125–184.
- McKinney, M.A., Dean, K., Hussey, N.E., Cliff, G., Wintner, S.P., Dudley, S.F.J., Zungu, M.P., Fisk, A.T., 2016. Global versus local causes and health implications of high mercury concentrations in sharks from the east coast of South Africa. *Science of The Total Environment* 541, 176–183. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.09.074
- McMeans, B.C., Svavarsson, J., Dennard, S., Fisk, A.T., 2010. Diet and resource use among Greenland sharks (*Somniosus microcephalus*) and teleosts sampled in Icelandic waters, using  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ , and mercury. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 67, 1428–1438. doi:10.1139/F10-072
- Messié, M., Chavez, F.P., 2015. Seasonal regulation of primary production in eastern boundary upwelling systems. *Progress in Oceanography* 134, 1–18. doi:10.1016/j.pocean.2014.10.011
- Metian, M., Warnau, M., Chouvelon, T., Pedraza, F., Rodriguez y Baena, A.M., Bustamante, P., 2013. Trace element bioaccumulation in reef fish from New Caledonia: Influence of trophic groups and risk assessment for consumers. *Marine Environmental Research* 87–88, 26–36. doi:10.1016/j.marenvres.2013.03.001
- Mieiro, C.L., Bervoets, L., Joosen, S., Blust, R., Duarte, A.C., Pereira, M.E., Pacheco, M., 2011. Metallothioneins failed to reflect mercury external levels of exposure and bioaccumulation in marine fish – Considerations on tissue and species specific responses. *Chemosphere* 85, 114–121. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.05.034
- Moltedo, O., Verde, C., Capasso, A., Parisi, E., Remondelli, P., Bonatti, S., Alvarez-Hernandez, X., Glass, J., Alvino, C.G., Leone, A., 2000. Zinc Transport and Metallothionein Secretion in the Intestinal Human Cell Line Caco-2. *J. Biol. Chem.* 275, 31819–31825. doi:10.1074/jbc.M002907200
- Moulis, J.-M., 2010. Cellular mechanisms of cadmium toxicity related to the homeostasis of essential metals. *Biometals* 23, 877–896. doi:10.1007/s10534-010-9336-y
- Moulis, J.-M., Bourguignon, J., Catty, P., 2014. CHAPTER 23:Cadmium, in: *Binding, Transport and Storage of Metal Ions in Biological Cells*. pp. 695–746. doi:10.1039/9781849739979-00695

# N

---

- Ndoye, S., 2016. Fonctionnement dynamique du centre d'upwelling sud-sénégalais : approche par la modélisation réaliste et l'analyse d'observations satellite de température de surface de la mer.
- Ndoye, S., Capet, X., Estrade, P., Sow, B., Machu, E., Brochier, T., Döring, J., Brehmer, P., 2017. Dynamics of a "low-enrichment high-retention" upwelling center over the southern Senegal shelf. *Geophys. Res. Lett.* 2017GL072789. doi:10.1002/2017GL072789
- Ng, T.Y.-T., Klinck, J.S., Wood, C.M., 2009. Does dietary Ca protect against toxicity of a low dietborne Cd exposure to the rainbow trout? *Aquatic Toxicology* 91, 75–86. doi:10.1016/j.aquatox.2008.10.008
- Ni, I., Wang, W., Tam, Y.K., 2000. Transfer of Cd, Cr and Zn from zooplankton prey to mudskipper *Periophthalmus cantonensis* and glassy *Ambassis urotaenia* fishes. *Mar Ecol Prog Ser* 194, 203–210. doi:10.3354/meps194203
- Niane, B., Guédron, S., Moritz, R., Cosio, C., Ngom, P.M., Deverajan, N., Pfeifer, H.R., Poté, J., 2015. Human exposure to mercury in artisanal small-scale gold mining areas of Kedougou region, Senegal, as a function of occupational activity and fish consumption. *Environ Sci Pollut Res* 22, 7101–7111. doi:10.1007/s11356-014-3913-5
- Njinkoué, J.-M., Barnathan, G., Miralles, J., Gaydou, E.-M., Samb, A., 2002. Lipids and fatty acids in muscle, liver and skin of three edible fish from the Senegalese coast: *Sardinella maderensis*, *Sardinella aurita* and *Cephalopholis taeniops*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 131, 395–402. doi:10.1016/S1096-4959(01)00506-1
- Nordberg, M., 1978. Studies on metallothionein and cadmium. *Environmental Research* 15, 381–404. doi:10.1016/0013-9351(78)90120-2
- Nriagu, J.O., 1989. A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature* 338, 47–49. doi:10.1038/338047a0

# O

---

- Odzak, N., Zvonaric, T., 1995. Cadmium and lead uptake from food by the fish. *Water Science and Technology* 32, 49–55. doi:10.1016/0273-1223(96)00069-8
- Official Journal of the European Union, 2006. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs.
- Official Journal of the European Union, n.d. COMMISSION REGULATION (EU).
- Ofukany, A.F.A., Wassenaar, L.I., Bond, A.L., Hobson, K.A., 2014. Defining fish community structure in Lake Winnipeg using stable isotopes ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{34}\text{S}$ ): Implications for monitoring

ecological responses and trophodynamics of mercury & other trace elements. *Science of The Total Environment* 497–498, 239–249. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.07.125

Okorie, O.E., Bae, J.Y., Lee, J.-H., Lee, S., Park, G.-H., Mohseni, M., Bai, S.C., 2014. Effects of Different Dietary Cadmium Levels on Growth and Tissue Cadmium Content in Juvenile Parrotfish, *Oplegnathus fasciatus*. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 27, 62–68. doi:10.5713/ajas.2011.11222

Oliva, M., José Vicente, J., Gravato, C., Guilhermino, L., Dolores Galindo-Riaño, M., 2012. Oxidative stress biomarkers in Senegal sole, *Solea senegalensis*, to assess the impact of heavy metal pollution in a Huelva estuary (SW Spain): Seasonal and spatial variation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 75, 151–162. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.08.017

Orbea, A., Fahimi, H.D., Cajaraville, M.P., 2000. Immunolocalization of four antioxidant enzymes in digestive glands of mollusks and crustaceans and fish liver. *Histochem Cell Biol* 114, 393–404. doi:10.1007/s004180000207

## P

---

Pan, K., Wang, W.-X., 2016. Radiocesium uptake, trophic transfer, and exposure in three estuarine fish with contrasting feeding habits. *Chemosphere* 163, 499–507. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.08.066

Pan, K., Wang, W.-X., 2009. Biodynamics To Explain the Difference of Copper Body Concentrations in Five Marine Bivalve Species. *Environ. Sci. Technol.* 43, 2137–2143. doi:10.1021/es802888u

Pelletier, E., 1986. Mercury-selenium interactions in aquatic organisms: A review. *Marine Environmental Research* 18, 111–132. doi:10.1016/0141-1136(86)90003-6

Pethybridge, H., Butler, E.C.V., Cossa, D., Daley, R., Boudou, A., 2012. Trophic structure and biomagnification of mercury in an assemblage of deepwater chondrichthyans from southeastern Australia. *Mar Ecol Prog Ser* 451, 163–174. doi:10.3354/meps09593

Pethybridge, H., Daley, R., Virtue, P., Nichols, P., 2010. Lipid composition and partitioning of deepwater chondrichthyans: inferences of feeding ecology and distribution. *Mar Biol* 157, 1367–1384. doi:10.1007/s00227-010-1416-6

Pethybridge, H., Daley, R.K., Nichols, P.D., 2011. Diet of demersal sharks and chimaeras inferred by fatty acid profiles and stomach content analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 409, 290–299. doi:10.1016/j.jembe.2011.09.009

Pierron, F., Baudrimont, M., Bossy, A., Bourdineaud, J., Brethes, D., Elie, P., Massabuau, J., 2007. Impairment of lipid storage by cadmium in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquatic Toxicology* 81, 304–311. doi:10.1016/j.aquatox.2006.12.014

Post, D.M., 2002. Using Stable Isotopes to Estimate Trophic Position: Models, Methods, and Assumptions. *Ecology* 83, 703–718. doi:10.1890/0012-9658(2002)083[0703:USITET]2.o.CO;2

- Post, D.M., Layman, C.A., Arrington, D.A., Takimoto, G., Quattrochi, J., Montaña, C.G., 2007. Getting to the fat of the matter: models, methods and assumptions for dealing with lipids in stable isotope analyses. *Oecologia* 152, 179–189. doi:10.1007/s00442-006-0630-x
- Pouil, S., Teyssié, J.-L., Rouleau, C., Fowler, S.W., Metian, M., Bustamante, P., Warnau, M., 2017. Comparative study of trophic transfer of the essential metals Co and Zn in two tropical fish: A radiotracer approach. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 486, 42–51. doi:10.1016/j.jembe.2016.09.005
- Pouil, S., Warnau, M., Oberhänsli, F., Teyssié, J.-L., Bustamante, P., Metian, M., 2016. Influence of food on the assimilation of essential elements (Co, Mn, and Zn) by turbot (*Scophthalmus maximus*). *Marine Ecology Progress Series* 550, 207–218. doi:10.3354/meps11716

## R

---

R Core Team, 2016.

- Rainbow, P.S., Luoma, S.N., Wang, W.-X., 2011. Trophically available metal – A variable feast. *Environmental Pollution, Nitrogen Deposition, Critical Loads and Biodiversity* 159, 2347–2349. doi:10.1016/j.envpol.2011.06.040
- Rebert, J.-P., 1982. Hydrologie et dynamique des eaux du plateau continental sénégalais. MyScienceWork.
- Regost, C., Arzel, J., Robin, J., Rosenlund, G., Kaushik, S.J., 2003. Total replacement of fish oil by soybean or linseed oil with a return to fish oil in turbot (*Psetta maxima*): 1. Growth performance, flesh fatty acid profile, and lipid metabolism. *Aquaculture* 217, 465–482. doi:10.1016/S0044-8486(02)00259-4
- Reinfelder, J.R., Fisher, N.S., 1994. Retention of elements absorbed by juvenile fish (*Menidia menidia*, *Menidia beryllina*) from zooplankton prey. *Limnol. Oceanogr.* 39, 1783–1789. doi:10.4319/lo.1994.39.8.1783
- Ripperger, S., Rehkämper, M., Porcelli, D., Halliday, A.N., 2007. Cadmium isotope fractionation in seawater — A signature of biological activity. *Earth and Planetary Science Letters* 261, 670–684. doi:10.1016/j.epsl.2007.07.034
- Rodríguez-González, P., Epov, V.N., Bridou, R., Tessier, E., Guyoneaud, R., Monperrus, M., Amouroux, D., 2009. Species-Specific Stable Isotope Fractionation of Mercury during Hg(II) Methylation by an Anaerobic Bacteria (*Desulfobulbus propionicus*) under Dark Conditions. *Environ. Sci. Technol.* 43, 9183–9188. doi:10.1021/es902206j
- Roméo, M., Bennani, N., Gnassia-Barelli, M., Lafaurie, M., Girard, J.P., 2000. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquatic Toxicology* 48, 185–194. doi:10.1016/S0166-445X(99)00039-9

- Roméo, M., Cosson, R.P., Gnassia-Barelli, M., Risso, C., Stien, X., Lafaurie, M., 1997. Metallothionein determination in the liver of the sea bass *Dicentrarchus labrax* treated with copper and B(a)P. *Marine Environmental Research* 44, 275–284. doi:10.1016/S0141-1136(97)00007-X
- Roméo, M., Gnassia-Barelli, M., 1988. *Donax trunculus* and *Venus verrucosa* as bioindicators of trace metal concentrations in Mauritanian coastal waters. *Mar. Biol.* 99, 223–227. doi:10.1007/BF00391984
- Roméo, M., Siau, Y., Sidoumou, Z., Gnassia-Barelli, M., 1999. Heavy metal distribution in different fish species from the Mauritania coast. *The Science of The Total Environment* 232, 169–175. doi:10.1016/S0048-9697(99)00099-6
- Romero, M.B., Polizzi, P., Chiodi, L., Robles, A., Das, K., Gerpe, M., 2016. Metals as chemical tracers to discriminate ecological populations of threatened Franciscana dolphins (*Pontoporia blainvillei*) from Argentina. *Environ Sci Pollut Res* 1–11. doi:10.1007/s11356-016-7970-9
- Rosabal, M., Pierron, F., Couture, P., Baudrimont, M., Hare, L., Campbell, P.G.C., 2015. Subcellular partitioning of non-essential trace metals (Ag, As, Cd, Ni, Pb, and Tl) in livers of American (*Anguilla rostrata*) and European (*Anguilla anguilla*) yellow eels. *Aquatic Toxicology* 160, 128–141. doi:10.1016/j.aquatox.2015.01.011
- Rouhi, A., Sif, J., Ferssiwi, A., Chemaa, A., 2007. Bioaccumulation de quelques éléments métalliques par deux espèces d'Annélides Polychètes du littoral de Jorf Lasfar (région d'El Jadida, Maroc). *Bulletin de l'Institut Scientifique* 81–87.
- Ruangsomboon, S., Wongrat, L., 2006. Bioaccumulation of cadmium in an experimental aquatic food chain involving phytoplankton (*Chlorella vulgaris*), zooplankton (*Moina macrocopa*), and the predatory catfish *Clarias macrocephalus* × *C. gariepinus*. *Aquatic Toxicology* 78, 15–20. doi:10.1016/j.aquatox.2006.01.015
- Rutherford, P.M., Dudas, M.J., Samek, R.A., 1994. Environmental impacts of phosphogypsum. *Science of The Total Environment* 149, 1–38. doi:10.1016/0048-9697(94)90002-7

## S

---

- Sabolić, I., Breljak, D., Škarica, M., Herak-Kramberger, C.M., 2010. Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. *Biometals* 23, 897–926. doi:10.1007/s10534-010-9351-z
- Sackett, D.K., Drazen, J.C., Choy, C.A., Popp, B., Pitz, G.L., 2015. Mercury Sources and Trophic Ecology for Hawaiian Bottomfish. *Environ. Sci. Technol.* 49, 6909–6918. doi:10.1021/acs.est.5b01009
- Sadiq, M., 1989. Marine chemistry of cadmium: A comparison of theoretical and field observations. *Environmental Technology Letters* 10, 1057–1070. doi:10.1080/09593338909384827

- Salas-Leiton, E., Anguis, V., Martín-Antonio, B., Crespo, D., Planas, J.V., Infante, C., Cañavate, J.P., Manchado, M., 2010. Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Potential effects on the immune response. *Fish & Shellfish Immunology* 28, 296–302. doi:10.1016/j.fsi.2009.11.006
- Sambe, B., Tandstad, M., Caramelo, A.M., Brown, B.E., 2016. Variations in productivity of the Canary Current Large Marine Ecosystem and their effects on small pelagic fish stocks. *Environmental Development, Thematic Issue - Ecosystem Based Management of Large Marine Ecosystems* 17, Supplement 1, 105–117. doi:10.1016/j.envdev.2015.11.012
- Sardenne, F., Bodin, N., Chassot, E., Amiel, A., Fouché, E., Degroote, M., Hollanda, S., Pethybridge, H., Lebreton, B., Guillou, G., Ménard, F., 2016. Trophic niches of sympatric tropical tuna in the Western Indian Ocean inferred by stable isotopes and neutral fatty acids. *Progress in Oceanography* 146, 75–88. doi:10.1016/j.pocean.2016.06.001
- Sasakura, C., T. Suzuki, K., 1998. Biological interaction between transition metals (Ag, Cd and Hg), selenide/sulfide and selenoprotein P. *Journal of Inorganic Biochemistry* 71, 159–162. doi:10.1016/S0162-0134(98)10048-X
- Schipper, L.A., Sparling, G.P., Fisk, L.M., Dodd, M.B., Power, I.L., Littler, R.A., 2011. Rates of accumulation of cadmium and uranium in a New Zealand hill farm soil as a result of long-term use of phosphate fertilizer. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 144, 95–101. doi:10.1016/j.agee.2011.08.002
- Scudiero, R., Temussi, P.A., Parisi, E., 2005. Fish and mammalian metallothioneins: a comparative study. *Gene, Structural Approaches to Sequence Evolution: Molecules, Networks, Populations – Part 1* 345, 21–26. doi:10.1016/j.gene.2004.11.024
- Senn, D.B., Chesney, E.J., Blum, J.D., Bank, M.S., Maage, A., Shine, J.P., 2010. Stable isotope (N, C, Hg) study of methylmercury sources and trophic transfer in the northern gulf of Mexico. *Environ. Sci. Technol.* 44, 1630–1637. doi:10.1021/es902361j
- Shiel, A.E., Weis, D., Cossa, D., Orians, K.J., 2013. Determining provenance of marine metal pollution in French bivalves using Cd, Zn and Pb isotopes. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 121, 155–167. doi:10.1016/j.gca.2013.07.005
- Shiel, A.E., Weis, D., Orians, K.J., 2012. Tracing cadmium, zinc and lead sources in bivalves from the coasts of western Canada and the USA using isotopes. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 76, 175–190. doi:10.1016/j.gca.2011.10.005
- Shiel, A.E., Weis, D., Orians, K.J., 2010. Evaluation of zinc, cadmium and lead isotope fractionation during smelting and refining. *Science of The Total Environment* 408, 2357–2368. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.02.016
- Sidoumou, Z., Gnassia-Barelli, M., Siau, Y., Morton, V., Roméo, M., 2006. Heavy metal concentrations in molluscs from the Senegal coast. *Environment International* 32, 384–387. doi:10.1016/j.envint.2005.09.001
- Sidoumou, Z., Gnassia-Barelli, M., Siau, Y., Morton, V., Roméo, M., 2005. Distribution and Concentration of Trace Metals in Tissues of Different Fish Species from the Atlantic Coast of Western Africa. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 74, 988–995. doi:10.1007/s00128-005-0677-0

- Sidoumou, Z., Gnassia-Barelli, M., Siau, Y., Romeo, M., 1999. Study of heavy metals in two species of molluscs from the Mauritania coast, *Crassostrea gigas* and *Perna perna*. *Journal de recherche oceanographique*. Paris 24, 13–18.
- Siscar, Rosario, Koenig, S., Torreblanca, A., Solé, M., 2014. The role of metallothionein and selenium in metal detoxification in the liver of deep-sea fish from the NW Mediterranean Sea. *Science of The Total Environment* 466–467, 898–905. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.07.081
- Siscar, R., Torreblanca, A., del Ramo, J., Solé, M., 2014. Modulation of metallothionein and metal partitioning in liver and kidney of *Solea senegalensis* after long-term acclimation to two environmental temperatures. *Environmental Research* 132, 197–205. doi:10.1016/j.envres.2014.04.020
- Siscar, R., Torreblanca, A., Palanques, A., Solé, M., 2013. Metal concentrations and detoxification mechanisms in *Solea solea* and *Solea senegalensis* from NW Mediterranean fishing grounds. *Marine Pollution Bulletin* 77, 90–99. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.10.026
- Smidt, G.A., Landes, F.C., Carvalho, L.M. de, Koschinsky, A., Schnug, E., 2011. Cadmium and Uranium in German and Brazilian Phosphorous Fertilizers, in: Merkel, B., Schipek, M. (Eds.), *The New Uranium Mining Boom*, Springer Geology. Springer Berlin Heidelberg, pp. 167–175. doi:10.1007/978-3-642-22122-4\_20
- Soto, D.X., Benito, J., Gacia, E., García-Berthou, E., Catalan, J., 2016. Trace metal accumulation as complementary dietary information for the isotopic analysis of complex food webs. *Methods Ecol Evol* n/a-n/a. doi:10.1111/2041-210X.12546
- St. John, M., Lund, T., 1996. Lipid biomarkers : Linking the utilization of frontal plankton biomass to enhanced condition of juvenile North Sea cod. *Marine Ecology - Progress Series* 131, 75–85. doi:10.3354/meps131075
- Stacey, N.H., Klaassen, C.D., 1980. Cadmium uptake by isolated rat hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 55, 448–455. doi:10.1016/0041-008X(80)90046-0
- Stowasser, G., Pond, D.W., Collins, M.A., 2012. Fatty acid trophic markers elucidate resource partitioning within the demersal fish community of South Georgia and Shag Rocks (Southern Ocean). *Marine Biology* 159, 2299–2310. doi:10.1007/s00227-012-2015-5
- Streets, D.G., Devane, M.K., Lu, Z., Bond, T.C., Sunderland, E.M., Jacob, D.J., 2011. All-Time Releases of Mercury to the Atmosphere from Human Activities. *Environ. Sci. Technol.* 45, 10485–10491. doi:10.1021/es202765m
- Szczebak, J.T., Taylor, D.L., 2011. Ontogenetic patterns in bluefish (*Pomatomus saltatrix*) feeding ecology and the effect on mercury biomagnification. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 1447–1458. doi:10.1002/etc.516



## T

---

- Takesue, R.K., van Geen, A., 2002. Nearshore circulation during upwelling inferred from the distribution of dissolved cadmium off the Oregon coast. *Limnol. Oceanogr.* 47, 176–185. doi:10.4319/llo.2002.47.1.0176
- Talas, Z.S., Orun, I., Ozdemir, I., Erdogan, K., Alkan, A., Yilmaz, I., 2008. Antioxidative role of selenium against the toxic effect of heavy metals (Cd<sup>2+</sup>, Cr<sup>3+</sup>) on liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792). *Fish Physiol Biochem* 34, 217–222. doi:10.1007/s10695-007-9179-9
- Teixeira, C.M., Cabral, H.N., 2010. Comparative analysis of the diet, growth and reproduction of the soles, *Solea solea* and *Solea senegalensis*, occurring in sympatry along the Portuguese coast. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 90, 995–1003. doi:10.1017/S0025315410000238
- Tenório-Daussat, C.L., Resende, M.C.M., Ziolli, R.L., Hauser-Davis, R.A., Schaumloffel, D., Saint’Pierre, T.D., 2014. Evaluation and standardization of different purification procedures for fish bile and liver metallothionein quantification by spectrophotometry and SDS-PAGE analyses. *Talanta* 120, 491–497. doi:10.1016/j.talanta.2013.11.070
- Tocher, D.R., 2003. Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. *Reviews in Fisheries Science* 11, 107–184. doi:10.1080/713610925
- Tort, L., Kargacin, B., Torres, P., Giralt, M., Hidalgo, J., 1996. The effect of cadmium exposure and stress on plasma cortisol, metallothionein levels and oxidative status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 114, 29–34. doi:10.1016/0742-8413(95)02107-8
- Twining, B.S., Baines, S.B., 2013. The Trace Metal Composition of Marine Phytoplankton. *Annual Review of Marine Science* 5, 191–215. doi:10.1146/annurev-marine-121211-172322
- Twining, B.S., Rauschenberg, S., Morton, P.L., Vogt, S., 2015. Metal contents of phytoplankton and labile particulate material in the North Atlantic Ocean. *Progress in Oceanography* 137, Part A, 261–283. doi:10.1016/j.pocean.2015.07.001

## U

---

- UN Food and Agriculture Organization (FAO). Heavy Metals Regulations Legal Notice No 66/2003. FAO, Rome., 2003.

## V

---

- Van Geen, A., Husby, D.M., 1996. Cadmium in the California Current System: Tracer of past and present upwelling. *J. Geophys. Res.* 101, 3489–3507. doi:10.1029/95JC03302
- Viarengo, A., Pertica, M., Canesi, L., Accomando, R., Mancinelli, G., Orunesu, M., 1989. Lipid peroxidation and level of antioxidant compounds (GSH, vitamin E) in the digestive glands of mussels of three different age groups exposed to anaerobic and aerobic conditions. *Marine Environmental Research, Responses of Marine Organisms to Pollutants* 28, 291–295. doi:10.1016/0141-1136(89)90246-8
- Vijver, M.G., van Gestel, C.A.M., Lanno, R.P., van Straalen, N.M., Peijnenburg, W.J.G.M., 2004. Internal Metal Sequestration and Its Ecotoxicological Relevance: A Review. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4705–4712. doi:10.1021/es040354g
- Vural, H., Demirin, H., Kara, Y., Eren, I., Delibas, N., 2010. Alterations of plasma magnesium, copper, zinc, iron and selenium concentrations and some related erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with Alzheimer's disease. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 24, 169–173. doi:10.1016/j.jtemb.2010.02.002
- Xu, Y., Wang, W., 2002. Exposure and potential food chain transfer factor of Cd, Se and Zn in marine fish *Lutjanus argentimaculatus*. *Mar Ecol Prog Ser* 238, 173–186. doi:10.3354/meps238173

## W

---

- Waeles, M., Planquette, H., Afandi, I., Delebecque, N., Bouthir, F., Donval, A., Shelley, R.U., Auger, P.-A., Riso, R.D., Tito de Morais, L., 2016. Cadmium in the waters off South Morocco: Nature of particles hosting Cd and insights into the mechanisms fractionating Cd from phosphate. *J. Geophys. Res. Oceans* 121, 3106–3120. doi:10.1002/2016JC011688
- Wallace, W.G., Lee, B.-G., Luoma, S.N., 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Marine Ecology Progress Series* 249, 15.
- Wallace, W.G., Luoma, S.N., 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. II. Significance of trophically available metal (TAM). *Marine Ecology Progress Series* 257, 13.
- Wang, W., Rainbow, P.S., 2006. Subcellular Partitioning and the Prediction of Cadmium Toxicity to Aquatic Organisms. *Environ. Chem.* 3, 395–399.
- Wang, W., Wong, R.S.K., 2003. Bioaccumulation kinetics and exposure pathways of inorganic mercury and methylmercury in a marine fish, the sweetlips *Plectorhinchus gibbosus*. *Mar Ecol Prog Ser* 261, 257–268. doi:10.3354/meps261257
- Wang, W.-X., Onsanit, S., Dang, F., 2012. Dietary bioavailability of cadmium, inorganic mercury, and zinc to a marine fish: Effects of food composition and type. *Aquaculture* 356–357, 98–104. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.05.031
- Wang, W.-X., Rainbow, P.S., 2010. Significance of metallothioneins in metal accumulation kinetics in marine animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 152, 1–8. doi:10.1016/j.cbpc.2010.02.015

- Westerlund, S., Aas, E., Andersen, O.K., 1998. The use of bile in fish in a screening method for trace metal exposure. *Marine Environmental Research, Pollutant Responses in Marine Organisms* 46, 601–604. doi:10.1016/S0141-1136(98)00017-8
- Wiederhold, J.G., 2015. Metal Stable Isotope Signatures as Tracers in Environmental Geochemistry. *Environ. Sci. Technol.* 49, 2606–2624. doi:10.1021/es504683e

## X

---

- Xu, Y., Wang, W., 2002. Exposure and potential food chain transfer factor of Cd, Se and Zn in marine fish *Lutjanus argentimaculatus*. *Mar Ecol Prog Ser* 238, 173–186. doi:10.3354/meps238173

## Z

---

- Zalups, R.K., Ahmad, S., 2003. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicology and Applied Pharmacology* 186, 163–188. doi:10.1016/S0041-008X(02)00021-2
- Zanden, M.J.V., Rasmussen, J.B., 2001. Variation in  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  trophic fractionation: Implications for aquatic food web studies. *Limnol. Oceanogr.* 46, 2061–2066. doi:10.4319/lo.2001.46.8.2061
- Zhang, L., Wang, W.-X., 2007a. Gastrointestinal uptake of cadmium and zinc by a marine teleost *Acanthopagrus schlegeli*. *Aquatic Toxicology* 85, 143–153. doi:10.1016/j.aquatox.2007.08.008
- Zhang, L., Wang, W.-X., 2007b. Waterborne cadmium and zinc uptake in a euryhaline teleost *Acanthopagrus schlegeli* acclimated to different salinities. *Aquatic Toxicology, A Tribute to Rick Playle: The Interface of Toxicology, Physiology, and Modeling in Improving Water Quality Regulations for Metals Proceedings of a Symposium: “SETAC 27th Annual Meeting. A Tribute to Rick Playle: The Interface of Toxicology, Physiology, and Modeling in Improving Water Quality Regulations for Metals”* 84, 173–181. doi:10.1016/j.aquatox.2007.03.027
- Zhang, L., Wang, W.-X., 2006a. Alteration of dissolved cadmium and zinc uptake kinetics by metal pre-exposure in the black sea bream (*Acanthopagrus schlegeli*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 1312–1321. doi:10.1897/05-262R.1
- Zhang, L., Wang, W.-X., 2006b. Significance of subcellular metal distribution in prey in influencing the trophic transfer of metals in a marine fish. *Limnol. Oceanogr.* 51, 2008–2017. doi:10.4319/lo.2006.51.5.2008
- Zhang, W., Wang, W.-X., Zhang, L., 2016. Comparison of Bioavailability and Biotransformation of Inorganic and Organic Arsenic to Two Marine Fish. *Environ. Sci. Technol.* 50, 2413–2423. doi:10.1021/acs.est.5b06307
- Zhao, W., Liu, W., Chen, X., Zhu, Y., Zhang, Z., Yao, H., Xu, S., 2014. Four Endoplasmic Reticulum Resident Selenoproteins May Be Related to the Protection of Selenium Against Cadmium Toxicity in Chicken Lymphocytes. *Biol Trace Elem Res* 161, 328–333. doi:10.1007/s12011-014-0135-0
- Zhao, X., Wang, W., Yu, K.N., Lam, P.K.S., 2001. Biomagnification of radiocesium in a marine piscivorous fish. *Mar Ecol Prog Ser* 222, 227–237. doi:10.3354/meps222227

# ANNEXES

**Matériel en supplément de l'article n°2 : La répartition subcellulaire détermine la toxicité et les cinétiques d'accumulation du cadmium chez deux espèces de poissons marins**

---

Species	Time	Element	Subcellular partitioning (%)																
			Total metal (ppm)		Cellular debris		Mitochondria		HDP		Organelles		MRG		HSP		Lipids		
			Control	Exposed	Control	Exposed	Control	Exposed	Control	Exposed	Control	Exposed	Control	Exposed	Control	Exposed	Control	Exposed	
<i>D. labrax</i>	Exposition	Cd	<b>0.54 ± 0.15</b>	<b>14.87 ± 3.08</b>	8.9 ± 2.8	16 ± 10.6	10.1 ± 2.4	12 ± 4.2	8.3 ± 2.5	6.3 ± 1.8	6.2 ± 5.3	2.7 ± 2.8	2.6 ± 0.7	4.5 ± 2.6	64 ± 3.8	58.5 ± 9.5	26.7 ± 10.8	17.3 ± 0.4	
		Ca	48.1 ± 39.5	68.4 ± 19.3	2.8 ± 0.7	15.1 ± 19.2	14.7 ± 19.7	17 ± 22.6	3.8 ± 2.3	2.7 ± 1.2	11.2 ± 9.2	9.1 ± 9.3	52.5 ± 17	40 ± 34.5	15 ± 7.8	16.2 ± 7.8			
		Cu	10.7 ± 6.8	9.9 ± 2	6.1 ± 1.1	16 ± 10.2	10.6 ± 2.2	12.3 ± 3.7	9 ± 2	7 ± 0.8	7 ± 6	3.4 ± 3.6	6.3 ± 2.2	8.6 ± 5.3	61 ± 3.2	52.6 ± 9.8			
		Fe	50 ± 32.3	27.8 ± 6.6	11.5 ± 4.8	21.6 ± 12.9	15.6 ± 6.2	15.8 ± 4.1	16.8 ± 14	6.3 ± 4.8	41.7 ± 26	34.7 ± 23.3	8.8 ± 3.9	17.6 ± 12.3	5.6 ± 3.1	4.1 ± 0.3			
		Mg	109 ± 54.6	88.8 ± 19	4 ± 0.8	11.6 ± 7.6	11.9 ± 3.5	13.5 ± 5.1	5.7 ± 3.7	3.1 ± 1.2	21.3 ± 20.5	10.4 ± 14.8	10 ± 4.2	20.2 ± 14.6	47.1 ± 11.8	41.2 ± 4.2			
		Mn	0.6 ± 0.3	0.4 ± 0.1	5.9 ± 1.5	16.9 ± 11.1	11.7 ± 2.5	13.2 ± 4.7	8.6 ± 6.5	3.1 ± 1.6	23.2 ± 18.2	14.7 ± 20.7	10 ± 2	20.9 ± 15.4	40.7 ± 8.1	31.1 ± 5.8			
		Se	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.3	17.3 ± 4.1	31.4 ± 15	11.8 ± 2.6	13.4 ± 4.4	24.5 ± 10.9	15.8 ± 5.8	21.7 ± 15.1	13.6 ± 14.8	4 ± 0.6	9.8 ± 6.2	20.6 ± 3.1	16.1 ± 2.6			
	Zn	16 ± 1.7	22.3 ± 12.9	11.2 ± 2.9	21.7 ± 11.5	10.8 ± 2.2	12.5 ± 2.8	26.8 ± 21.4	15.6 ± 10.6	19.9 ± 17	13.5 ± 16.6	2.6 ± 0.4	10.7 ± 6.9	28.8 ± 5.4	25.9 ± 6.5				
	Depuration	Cd	<b>0.32 ± 0.02</b>	<b>7.21 ± 0.72</b>	5.3 ± 0.4	4.1 ± 1	11.2 ± 2.4	8.1 ± 2.3	8.5 ± 1.5	9 ± 1.4	20.1 ± 0.9	15.4 ± 4.7	1.3 ± 0.3	1.6 ± 0.7	53.7 ± 1.4	61.8 ± 5.6	24.9 ± 0.5	17.6 ± 8.9	
		Ca	9 ± 2.4	25.8 ± 29	5.1 ± 5.8	2 ± 0.9	4.3 ± 3.5	2.3 ± 0.5	5.2 ± 4.7	3.9 ± 1.7	18.4 ± 16.3	12.9 ± 3.1	53.8 ± 42.8	69.3 ± 4.1	13.2 ± 12.6	9.6 ± 3.7			
		Cu	8 ± 1.2	10.1 ± 1.8	4.3 ± 0.5	3.7 ± 0.5	11.3 ± 2.2	8.3 ± 2.3	8.6 ± 1.5	9.1 ± 1.6	20.2 ± 1.2	16.5 ± 4.8	2.4 ± 0.7	2.5 ± 1.3	53.2 ± 1.2	59.8 ± 5.9			
		Fe	18.6 ± 2.9	20.7 ± 3.4	5.3 ± 0.4	4.5 ± 0.7	10.7 ± 1.8	8.1 ± 2.2	18 ± 1.5	15.4 ± 2.2	56.6 ± 1.2	60.6 ± 12.8	2.7 ± 0.5	3.1 ± 1.5	6.7 ± 2	8.3 ± 8.3			
		Mg	57.5 ± 3.4	62.5 ± 0.7	3.8 ± 0.9	2.8 ± 0.4	9 ± 1.4	6.6 ± 1.9	7.5 ± 0.6	7.3 ± 0.6	42.1 ± 1	40.3 ± 5.4	3.8 ± 1.3	4.2 ± 1.1	33.7 ± 1.8	38.8 ± 5.7			
		Mn	0.3 ± 0	0.3 ± 0	4.6 ± 1.2	3.9 ± 0.6	9.9 ± 1.5	7.6 ± 1.8	12.1 ± 0.5	11.6 ± 1.1	38.2 ± 2.3	37.7 ± 4.2	5.8 ± 2.6	6.1 ± 0.7	29.3 ± 1.9	33 ± 4.5			
Se		0.2 ± 0	0.3 ± 0	9.2 ± 0.4	9.6 ± 1.9	10.2 ± 1.6	8.5 ± 1.5	29.2 ± 2.2	31.2 ± 1.7	31.7 ± 1.2	28.4 ± 5.5	3.1 ± 0.3	3.9 ± 1	16.6 ± 0.1	18.6 ± 3.1				
Zn	12.3 ± 1.3	13 ± 2	6.4 ± 0.5	6.1 ± 1.6	10.6 ± 2.3	8 ± 2.5	32.3 ± 1.8	33.1 ± 3.2	28.1 ± 0.8	23.5 ± 5	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.2	<b>21.1 ± 1.9</b>	<b>27.7 ± 2.1</b>					
<i>S. senegalensis</i>	Exposition	Cd	<b>0.84 ± 0.17</b>	<b>10.11 ± 1.86</b>	54.8 ± 7	55.2 ± 5.3	8.2 ± 8.4	3.8 ± 1.2	1.6 ± 1.6	0.5 ± 0	15.3 ± 3.3	5.4 ± 5.6	10.4 ± 3.7	25.9 ± 11.6	9.6 ± 1.2	9.2 ± 0.1	29.3 ± 9.8		
		Ca	69.2 ± 49.1	42.5 ± 39.7	25 ± 4.4	26.9 ± 18.4	5.9 ± 2.9	3.1 ± 0.7	3 ± 1.1	1.9 ± 0.6	6.7 ± 1.8	8.3 ± 11	36.2 ± 10.5	41.3 ± 27.9	23.2 ± 6.9	18.6 ± 5			
		Cu	75.7 ± 32.1	66 ± 35.6	59 ± 7.6	56.4 ± 12.7	7.6 ± 8.3	3.2 ± 0.2	5.4 ± 4.4	1.6 ± 0.6	14.4 ± 1.5	8.2 ± 4.4	11.8 ± 2.4	28.4 ± 14.3	1.6 ± 1.3	2.2 ± 1.9			
		Fe	10.7 ± 4.7	8.3 ± 2.5	38.6 ± 7	39.4 ± 6.1	8.5 ± 7.7	4.6 ± 1.6	19.5 ± 6.6	9.2 ± 6.3	13.8 ± 2.9	12.1 ± 3.7	14.8 ± 2.6	26.7 ± 14	4.9 ± 0.5	7.9 ± 5.4			
		Mg	121 ± 20.7	86.5 ± 11.9	26.5 ± 5	20.2 ± 15.1	8.7 ± 6.8	4.6 ± 2.4	2.4 ± 0.5	1.9 ± 0.2	6.2 ± 2.3	3.2 ± 2.3	16.8 ± 4.5	30.2 ± 14.2	39.4 ± 3.5	40 ± 5.5			
		Mn	1 ± 0	1.2 ± 0.1	35.6 ± 3.2	25.7 ± 12.8	8.6 ± 7.3	4.6 ± 2.1	1.9 ± 0.4	1.6 ± 0.2	8.2 ± 1.9	3.8 ± 3.7	19 ± 2.6	37.5 ± 18.2	26.6 ± 3.2	26.8 ± 1.2			
		Se	1.4 ± 0.5	1.6 ± 0.5	51.3 ± 15.6	65 ± 5.8	8.9 ± 8.1	3.6 ± 0.5	7.4 ± 4.3	3.6 ± 0.6	<b>19.4 ± 6.9</b>	<b>6.7 ± 3.2</b>	5.4 ± 1.9	13.4 ± 8	7.5 ± 4	7.6 ± 3.1			
	Zn	11.5 ± 1.8	14.3 ± 1.7	41 ± 6.8	47.3 ± 0.9	9.5 ± 6.7	6.5 ± 1.1	6 ± 4	3 ± 0.3	<b>18 ± 3.9</b>	<b>6.7 ± 5.2</b>	6.7 ± 3	15.4 ± 5.6	18.9 ± 1.8	21 ± 0.7				
	Depuration	Cd	<b>0.98 ± 0.41</b>	<b>9.72 ± 2.76</b>	15.9 ± 8.1	12.3 ± 2.6	5.6 ± 3.1	4 ± 1.5	21 ± 7.3	18.8 ± 1.1	<b>37.3 ± 5.9</b>	<b>51.5 ± 4.8</b>	16.4 ± 9	9.2 ± 5.1	3.9 ± 2.4	4.1 ± 2.2	44.1 ± 9.8		
		Ca	81.1 ± 57.6	16.5 ± 3.6	7.3 ± 5.6	6.8 ± 0.9	5 ± 1.5	3.3 ± 1.4	4.2 ± 1.1	4.2 ± 1.3	28.3 ± 10.2	39.5 ± 14.7	37.7 ± 16.9	32.6 ± 13.7	17.5 ± 2	13.5 ± 2.3			
		Cu	52.9 ± 2.8	47.4 ± 2.1	16.7 ± 8.1	12.1 ± 2.8	4.7 ± 2.3	3.7 ± 1.3	21.2 ± 7.1	20 ± 4	36.6 ± 6.3	49.3 ± 7.6	16.9 ± 9.6	8.1 ± 2.8	3.9 ± 3.3	6.8 ± 3.4			
		Fe	4.8 ± 0.4	6.1 ± 2	13.6 ± 6.2	13 ± 1.7	6.6 ± 3.1	5.1 ± 1	23.9 ± 8.5	24.7 ± 5	<b>30.1 ± 2.4</b>	<b>41.2 ± 1.4</b>	<b>16.9 ± 3.2</b>	<b>9.2 ± 2.6</b>	8.9 ± 1.3	6.8 ± 1.3			
		Mg	91.1 ± 20.7	82 ± 6.9	10.4 ± 6.8	8.5 ± 1.2	6.8 ± 3.6	4.4 ± 1.2	4.1 ± 0.7	4.2 ± 0.5	<b>36.5 ± 6.4</b>	<b>52.1 ± 3.4</b>	<b>13.6 ± 2.7</b>	<b>7.7 ± 1.3</b>	28.6 ± 2.9	23 ± 4.3			
		Mn	1.2 ± 0.2	1.2 ± 0.1	11.2 ± 7.6	9.5 ± 1.1	6.6 ± 3.3	4.8 ± 1.3	5.5 ± 1.4	5.9 ± 1	<b>36.8 ± 3.7</b>	<b>49.4 ± 1.8</b>	<b>16.8 ± 3</b>	<b>10.3 ± 1.5</b>	23 ± 4.2	20.1 ± 2.8			
Se		1 ± 0	0.9 ± 0.1	23.3 ± 6.9	17.9 ± 3.4	6.1 ± 2.3	5.1 ± 0.4	15.5 ± 5.4	15.3 ± 1.6	32.8 ± 3.9	43.6 ± 6.8	10.6 ± 6.8	5.8 ± 1.4	11.6 ± 2.9	12.3 ± 1.5				
Zn	9.7 ± 1.7	11.7 ± 2.4	17.9 ± 4.1	14.9 ± 3.4	8 ± 2.7	5.3 ± 1.3	26.2 ± 6.4	24.5 ± 2.3	31.4 ± 3.2	43.3 ± 4.1	10.6 ± 7	7.4 ± 2.2	5.8 ± 0.5	4.6 ± 0.9					

**Table 1** Total metal concentration (ppm dry weight, mean ± sd) and subcellular partitioning (% of the total metal contained in each fraction, mean ± sd) of metal elements after 60 days of Cd dietary exposition and after 60 days of depuration in the liver of the sea bass *Dicentrarchus labrax* and the senegalese sole *Solea senegalensis* for both conditions (exposed and control fish). Metal repartition significantly differed between control and exposed fish for values in bold (ANOVA,  $p < 0.05$ ). No difference between control and exposed fish was found in total metal concentration in the liver of both species, neither in metal repartition in cellular debris, mitochondria and heat denaturable proteins (HDP) fractions.

**Matériel en supplément de l'article n°3 : Trophic ecology  
influence on metal bioaccumulation in marine fish: inference  
from stable isotopes and fatty acid analyses**

---

Station	Sample	Species	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$ normalised	C/N
Dakar	Bb1	<i>Boops boops</i>	10.1	-16	-16	3.3
	Bb2	<i>Boops boops</i>	10	-16	-16.1	3.3
	Bb3	<i>Boops boops</i>	10.5	-14.7	-14.7	3.4
	Bb4	<i>Boops boops</i>	9.9	-15.9	-16	3.3
	Bb5	<i>Boops boops</i>	10.1	-16	-16.1	3.3
	Cr1	<i>Caranx rhonchus</i>	11.7	-14.9	-15.9	4
	Cr2	<i>Caranx rhonchus</i>	11.4	-15.3	-15.6	3.3
	Cr3	<i>Caranx rhonchus</i>	11.6	-16.5	-14.9	3.3
	Cr4	<i>Caranx rhonchus</i>	11.4	-15.5	-15.3	3.4
	Db1	<i>Diplodus bellottii</i>	12.9	-14.4	-14.5	3.2
	Db2	<i>Diplodus bellottii</i>	12.4	-15.3	-15.3	3.3
	Db3	<i>Diplodus bellottii</i>	11.9	-14.8	-14.9	3.3
	Db4	<i>Diplodus bellottii</i>	12.2	-15.6	-15.7	3.3
	Db5	<i>Diplodus bellottii</i>	12.3	-14.9	-15	3.3
	Pp1	<i>Pseudupeneus prayensis</i>	11.9	-15.5	-15.5	3.3
	Pp2	<i>Pseudupeneus prayensis</i>	11.9	-15.7	-15.8	3.3
	Pp3	<i>Pseudupeneus prayensis</i>	12.1	-15.7	-15.8	3.3
	Pp4	<i>Pseudupeneus prayensis</i>	11.2	-16.3	-16.3	3.3
	Pp5	<i>Pseudupeneus prayensis</i>	12.1	-15	-15.1	3.3
	Sj1	<i>Scomber japonicus</i>	7.9	-16.6	-16.5	3.4
	Sj2	<i>Scomber japonicus</i>	7.8	-16.2	-16.3	3.2
	Sj3	<i>Scomber japonicus</i>	8	-16.8	-16.6	3.5
	Sj4	<i>Scomber japonicus</i>	8.5	-17.3	-17.2	3.5
	Sj5	<i>Scomber japonicus</i>	8	-16.8	-16.9	3.3
	Tt1	<i>Trachurus trecae</i>	10.9	-16.8	-16.7	3.5
Tt2	<i>Trachurus trecae</i>	10.6	-16.3	-16	3.7	
Tt3	<i>Trachurus trecae</i>	10.9	-16.8	-16.6	3.5	
Tt4	<i>Trachurus trecae</i>	11.1	-17	-16.4	4	
Tt5	<i>Trachurus trecae</i>	11.1	-16.9	-16.4	3.9	
Casamance	Ba1	<i>Brachydeuterus auritus</i>	13.5	-15.1	-15.2	3.3
	Ba2	<i>Brachydeuterus auritus</i>	14.2	-15.4	-15.6	3.2
	Ba3	<i>Brachydeuterus auritus</i>	13.5	-15.1	-15.2	3.3
	Ba4	<i>Brachydeuterus auritus</i>	13.6	-15.3	-15.3	3.3
	Ba5	<i>Brachydeuterus auritus</i>	13.7	-15.2	-15.2	3.3
	Cc1	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	13.1	-16.4	-16.4	3.4
	Cc2	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	13.7	-17	-16.4	3.9
	Cc3	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	14.2	-15.7	-15.6	3.4
	Cc4	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	13.1	-18.6	-17.2	4.8
	Cc5	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	13.1	-17.5	-16.9	4
	Cr1	<i>Caranx rhonchus</i>	12.4	-15.3	-15.5	3.2
	Cr2	<i>Caranx rhonchus</i>	14.3	-15.5	-15.3	3.6
	Cr3	<i>Caranx rhonchus</i>	14.3	-14.7	-14.8	3.2
	Cr4	<i>Caranx rhonchus</i>	13.7	-15.4	-15.3	3.5
	Cr5	<i>Caranx rhonchus</i>	14.4	-14.9	-15	3.2
	Gd1	<i>Galeoides decadactylus</i>	13.4	-15.5	-15.6	3.3
	Gd2	<i>Galeoides decadactylus</i>	13.7	-15.3	-15.3	3.3
	Gd3	<i>Galeoides decadactylus</i>	13.7	-15.9	-16	3.3
	Gd4	<i>Galeoides decadactylus</i>	13.3	-15.8	-15.7	3.5
	Gd5	<i>Galeoides decadactylus</i>	13.5	-15.6	-15.7	3.3
	Sd1	<i>Selene dorsalis</i>	13.4	-16.8	-16.4	3.8
	Sd2	<i>Selene dorsalis</i>	12.3	-16.6	-16.5	3.4
	Sd3	<i>Selene dorsalis</i>	14.1	-15.3	-15.4	3.2
	Sd4	<i>Selene dorsalis</i>	12.4	-15.6	-15.6	3.4
	Sd5	<i>Selene dorsalis</i>	14.1	-16.2	-16.2	3.3
Sg1	<i>Sphyræna guachancho</i>	14.7	-15.6	-15.7	3.2	
Sg2	<i>Sphyræna guachancho</i>	12.9	-15.8	-15.9	3.2	
Sg3	<i>Sphyræna guachancho</i>	14.3	-16	-16.1	3.2	
Sg4	<i>Sphyræna guachancho</i>	14	-15.9	-15.8	3.4	
Sg5	<i>Sphyræna guachancho</i>	12.9	-15.1	-15.3	3.2	

Table 2  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$  (before and after normalisation) and C/N ratios of the individual fish from the two locations.







## Matériel en supplément de l'article n°4 : Foraging habitat drives mercury accumulation in marine fish species despite high intraspecific variability

---

Location	Species	Habitat	Identity	Length (mm)	Weight (mg)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Shore	Cluster	Hg (dry weight)	Hg (wet weight)
Casamance	<i>Brachydeuterus auritus</i>	benthopelagic	Ba 2-4	215	127	14.212	-15.563	in	2	0.381	0.095
Casamance	<i>Brachydeuterus auritus</i>	benthopelagic	Ba 4-4	209	126	13.563	-15.336	in	2	0.241	0.06
Casamance	<i>Brachydeuterus auritus</i>	benthopelagic	Ba 5-4	206	135	13.677	-15.239	in	2	0.287	0.072
Casamance	<i>Brachydeuterus auritus</i>	benthopelagic	Ba 1-4	208	127	13.496	-15.226	in	2	0.462	0.116
Casamance	<i>Brachydeuterus auritus</i>	benthopelagic	Ba 3-4	203	121	13.52	-15.177	in	2	0.378	0.094
Casamance	<i>Caranx rhonchus</i>	benthopelagic	Tt 1-4	355	337	12.401	-15.507	in	2	0.693	0.173
Casamance	<i>Caranx rhonchus</i>	benthopelagic	Tt 4-4	280	242	13.686	-15.28	in	2	0.15	0.038
Casamance	<i>Caranx rhonchus</i>	benthopelagic	Tt 2-4	327	365	14.251	-15.262	in	2	0.466	0.116
Casamance	<i>Caranx rhonchus</i>	benthopelagic	Tt 5-4	354	426	14.403	-14.967	in	2	0.512	0.128
Casamance	<i>Caranx rhonchus</i>	benthopelagic	Tt 3-4	330	302	14.251	-14.825	in	2	1.065	0.266
Casamance	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	pelagic	Cc 8-4	198	72	12.949	-17.283	in	1	0.094	0.023
Casamance	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	pelagic	Cc 7-4	200	65	13.089	-17.158	in	1	0.063	0.016
Casamance	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	pelagic	Cc 10-4	196	72	13.088	-16.85	in	1	0.074	0.019
Casamance	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	pelagic	Cc 4-4	195	64	13.711	-16.385	in	1	0.068	0.017
Casamance	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	pelagic	Cc 1-4	194	65	13.144	-16.355	in	1	0.095	0.024
Casamance	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	pelagic	Cc 3-4	221	80	14.161	-15.992	in	1	0.13	0.032
Casamance	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	pelagic	Cc 2-4	195	65	13.351	-15.964	in	1	0.121	0.03
Casamance	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	pelagic	Cc 9-4	201	78	13.721	-15.75	in	2	0.131	0.033
Casamance	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	pelagic	Cc 6-4	201	78	13.711	-15.705	in	2	0.106	0.027
Casamance	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	pelagic	Cc 5-4	211	87	14.202	-15.632	in	2	0.136	0.034
Casamance	<i>Galeoides decadactylus</i>	demersal	Gd 3-4	176	68	13.722	-15.984	in	1	0.083	0.021
Casamance	<i>Galeoides decadactylus</i>	demersal	Gd 5-4	184	71	13.487	-15.693	in	2	0.088	0.022
Casamance	<i>Galeoides decadactylus</i>	demersal	Gd 4-4	192	83	13.251	-15.667	in	2	0.075	0.019
Casamance	<i>Galeoides decadactylus</i>	demersal	Gd 1-4	162	46	13.41	-15.552	in	2	0.081	0.02
Casamance	<i>Galeoides decadactylus</i>	demersal	Gd 2-4	165	47	13.705	-15.343	in	2	0.081	0.02
Casamance	<i>Selene dorsalis</i>	demersal	Sd 2-4	255	188	12.307	-16.51	in	1	0.285	0.071
Casamance	<i>Selene dorsalis</i>	demersal	Sd 1-4	228	137	13.417	-16.367	in	1	0.229	0.057
Casamance	<i>Selene dorsalis</i>	demersal	Sd 5-4	252	188	14.067	-16.2	in	1	0.183	0.046
Casamance	<i>Selene dorsalis</i>	demersal	Sd 4-4	253	181	12.428	-15.59	in	2	0.174	0.044
Casamance	<i>Selene dorsalis</i>	demersal	Sd 3-4	232	156	14.134	-15.419	in	2	0.284	0.071
Casamance	<i>Sphyaena guachancho</i>	pelagic	Sg 3-4	312	145	14.345	-16.098	in	1	0.186	0.047
Casamance	<i>Sphyaena guachancho</i>	pelagic	Sg 2-4	336	175	12.871	-15.942	in	1	0.238	0.06
Casamance	<i>Sphyaena guachancho</i>	pelagic	Sg 4-4	346	219	14.028	-15.806	in	2	0.164	0.041
Casamance	<i>Sphyaena guachancho</i>	pelagic	Sg 1-4	328	169	14.724	-15.739	in	2	0.136	0.034
Casamance	<i>Sphyaena guachancho</i>	pelagic	Sg 5-4	400	281	12.926	-15.255	in	2	0.477	0.119
Dakar	<i>Boops boops</i>	demersal	Bb 5-4	195	73.58	10.118	-16.143	in	1	0.116	0.029
Dakar	<i>Boops boops</i>	demersal	Bb 2-4	197	72.95	10.029	-16.063	in	1	0.296	0.074
Dakar	<i>Boops boops</i>	demersal	Bb 1-4	159	24.02	10.117	-16.026	in	1	0.046	0.011
Dakar	<i>Boops boops</i>	demersal	Bb 4-4	186	73.35	9.853	-15.976	in	1	0.073	0.018
Dakar	<i>Boops boops</i>	demersal	Bb 3-4	196	74.83	10.493	-14.661	in	2	0.149	0.037
Dakar	<i>Caranx rhonchus</i>	benthopelagic	Cr 1 M Iso	185	77.35	11.62	-15.906	in	2	0.048	0.012
Dakar	<i>Caranx rhonchus</i>	benthopelagic	Cr 2 M Iso	190	84.97	11.347	-15.604	in	2	0.053	0.013
Dakar	<i>Caranx rhonchus</i>	benthopelagic	Cr 4-4	207	95.21	11.44	-15.26	in	2	0.046	0.011
Dakar	<i>Caranx rhonchus</i>	benthopelagic	Cr 3-4	215	107.49	11.719	-14.919	in	2	0.073	0.018
Dakar	<i>Diplodus bellottii</i>	demersal	Db 4-4	172	74.67	12.17	-15.649	in	2	0.307	0.077
Dakar	<i>Diplodus bellottii</i>	demersal	Db 2-4	172	85.71	12.413	-15.302	in	2	0.199	0.05
Dakar	<i>Diplodus bellottii</i>	demersal	Db 5-4	164	75.56	12.308	-15.005	in	2	0.332	0.083
Dakar	<i>Diplodus bellottii</i>	demersal	Db 3-4	166	66.2	11.933	-14.933	in	2	0.423	0.106
Dakar	<i>Diplodus bellottii</i>	demersal	Db 1-4	174	87.32	12.87	-14.524	in	2	0.428	0.107
Dakar	<i>Pseudupeneus prayensis</i>	demersal	Pp 8-4	225	154.9	11.24	-16.332	in	1	0.214	0.053
Dakar	<i>Pseudupeneus prayensis</i>	demersal	Pp 6-4 Hann	220	128.91	11.935	-15.767	in	2	0.186	0.047

Dakar	<i>Pseudupeneus prayensis</i>	demersal	Pp 7-4	181	70.8	12.1	-15.754	in	2	0.1	0.025
Dakar	<i>Pseudupeneus prayensis</i>	demersal	Pp 10-4	210	108.96	11.893	-15.518	in	2	0.261	0.065
Dakar	<i>Pseudupeneus prayensis</i>	demersal	Pp 9-4	220	139.51	12.133	-15.126	in	2	0.287	0.072
Dakar	<i>Scomber japonicus</i>	pelagic	Sj 4-4	152	25.27	8.471	-17.158	off	1	0.029	0.007
Dakar	<i>Scomber japonicus</i>	pelagic	Sj 5-4	163	32.1	7.961	-16.929	off	1	0.048	0.012
Dakar	<i>Scomber japonicus</i>	pelagic	Sj 3-4	164	34.3	8.026	-16.62	off	1	0.034	0.009
Dakar	<i>Scomber japonicus</i>	pelagic	Sj 1-4	162	33.08	7.855	-16.497	off	1	0.035	0.009
Dakar	<i>Scomber japonicus</i>	pelagic	Sj 2-4	169	39.7	7.751	-16.301	off	1	0.04	0.01
Dakar	<i>Trachurus trecae</i>	benthopelagic	Tae 1 Muscle Iso	215	97.8	10.92	-16.673	in	1	0.142	0.035
Dakar	<i>Trachurus trecae</i>	benthopelagic	Tae 3 Muscle Iso	216	95.89	10.941	-16.621	in	1	0.126	0.032
Dakar	<i>Trachurus trecae</i>	benthopelagic	Tae 5 Muscle Iso	225	103.62	11.05	-16.405	in	1	0.105	0.026
Dakar	<i>Trachurus trecae</i>	benthopelagic	Tae 4 Muscle Iso	218	105.75	11.047	-16.389	in	1	0.101	0.025
Dakar	<i>Trachurus trecae</i>	benthopelagic	Tae 2 Muscle Iso	218	94.88	10.617	-16.025	in	1	0.1	0.025
Grande côte	<i>Trachurus trecae</i>	benthopelagic	Tt 15-4	307	260	11.209	-16.188	in	1	0.097	0.024
Grande côte	<i>Trachurus trecae</i>	benthopelagic	Tt 13-4	305	277	11.26	-16.055	in	1	0.1	0.025
Grande côte	<i>Trachurus trecae</i>	benthopelagic	Tt 17-4	262	181	11.282	-15.903	in	2	0.06	0.015
Grande côte	<i>Trachurus trecae</i>	benthopelagic	Tt 14-4	304	239	11.55	-15.407	in	2	0.144	0.036
Grande côte	<i>Trachurus trecae</i>	benthopelagic	Tt 16-4	295	239	11.527	-15.233	in	2	0.07	0.018
Saint Louis	<i>Brotula barbata</i>	demersal	BB 2-4	303	197.94	11.284	-17.102	off	1	0.075	0.019
Saint Louis	<i>Brotula barbata</i>	demersal	BB 3-4	340	294.93	11.003	-17.04	off	1	0.087	0.022
Saint Louis	<i>Brotula barbata</i>	demersal	BB 1-4	330	282	11.171	-16.963	off	1	0.085	0.021
Saint Louis	<i>Brotula barbata</i>	demersal	BB 5-4	370	376.35	11.107	-16.866	off	1	0.106	0.026
Saint Louis	<i>Merluccius senegalensis</i>	demersal	Ms 2-4	353	328.83	11.289	-16.646	off	1	0.196	0.049
Saint Louis	<i>Merluccius senegalensis</i>	demersal	Ms 4-4	349	303.5	11.367	-16.58	off	1	0.097	0.024
Saint Louis	<i>Merluccius senegalensis</i>	demersal	Ms 3-4	364	370.5	11.066	-16.536	off	1	0.131	0.033
Saint Louis	<i>Merluccius senegalensis</i>	demersal	Ms 5-4	364	312.94	12.533	-15.971	off	1	0.292	0.073
Saint Louis	<i>Merluccius senegalensis</i>	demersal	Ms 1-4	392	438.4	11.878	-15.915	off	2	0.369	0.092
Saint Louis	<i>Pterothrissus belloci</i>	demersal	Pb 2-4	262	117.29	11.125	-16.657	off	1	0.066	0.017
Saint Louis	<i>Pterothrissus belloci</i>	demersal	Pb 5-4	278	152.29	11.359	-16.564	off	1	0.122	0.031
Saint Louis	<i>Pterothrissus belloci</i>	demersal	Pb 4-4	275	140.6	11.028	-16.489	off	1	0.095	0.024
Saint Louis	<i>Pterothrissus belloci</i>	demersal	Pb 1-4	233	80.7	11.088	-16.478	off	1	0.065	0.016
Saint Louis	<i>Pterothrissus belloci</i>	demersal	Pb 3-4	233	84.25	11.123	-16.472	off	1	0.07	0.017
Saint Louis	<i>Trichiurus lepturus</i>	benthopelagic	TI 2-4	737	239.64	11.287	-16.759	off	1	0.069	0.017
Saint Louis	<i>Trichiurus lepturus</i>	benthopelagic	TI 1-4	755	275.87	11.432	-16.708	off	1	0.074	0.018
Saint Louis	<i>Trichiurus lepturus</i>	benthopelagic	TI 4-4	642	164.25	11.23	-16.697	off	1	0.052	0.013
Saint Louis	<i>Trichiurus lepturus</i>	benthopelagic	TI 5-4	676	181.65	11.17	-16.432	off	1	0.047	0.012
Saint Louis	<i>Trichiurus lepturus</i>	benthopelagic	TI 3-4	727	254.98	11.938	-16.271	off	1	0.071	0.018
Saint Louis	<i>Zeus faber</i>	benthopelagic	Zf 1-4	264	257.05	12.108	-16.128	off	1	0.119	0.03
Saint Louis	<i>Zeus faber</i>	benthopelagic	Zf 3-4	369	634.34	11.487	-15.236	off	2	0.187	0.047
Saint Louis	<i>Zeus faber</i>	benthopelagic	Zf 5-4	393	959.83	11.659	-15.064	off	2	0.175	0.044
Saint Louis	<i>Zeus faber</i>	benthopelagic	Zf 4-4	361	614.19	12.102	-14.823	off	2	0.227	0.057
Saint Louis	<i>Zeus faber</i>	benthopelagic	Zf 2-4	372	839.85	12.815	-14.749	off	2	0.207	0.052
Saloum	<i>Chaetodon hoefleri</i>	demersal	Ch 1-4	176	152	16.921	-16.337	in	1	0.102	0.026
Saloum	<i>Chaetodon hoefleri</i>	demersal	Ch 2-4	168	123	15.97	-15.884	in	2	0.047	0.012
Saloum	<i>Chaetodon hoefleri</i>	demersal	Ch 4-4	178	168	13.56	-14.974	in	2	0.176	0.044
Saloum	<i>Chaetodon hoefleri</i>	demersal	Ch 3-4	185	156	14.147	-14.816	in	2	0.251	0.063
Saloum	<i>Chaetodon hoefleri</i>	demersal	Ch 5-4	165	139	15.22	-14.755	in	2	0.12	0.03
Saloum	<i>Chelidonichthys gabonensis</i>	demersal	Cg 4-4	224	108	10.723	-17.5	in	2	0.522	0.13
Saloum	<i>Chelidonichthys gabonensis</i>	demersal	Cg 3-4	125	85	10.914	-17.099	in	2	0.467	0.117
Saloum	<i>Chelidonichthys gabonensis</i>	demersal	Cg 5-4	220	101	10.594	-16.818	in	2	0.408	0.102
Saloum	<i>Chelidonichthys gabonensis</i>	demersal	Cg 2-4	224	106	11.174	-16.795	in	2	0.258	0.065
Saloum	<i>Chelidonichthys gabonensis</i>	demersal	Cg 1-4	100	219	11.009	-16.606	in	2	0.193	0.048
Saloum	<i>Dentex canariensis</i>	demersal	Dc 2-4	265	307	12.384	-17.129	in	1	0.484	0.121
Saloum	<i>Dentex canariensis</i>	demersal	Dc 1-4	263	285	12.65	-16.644	in	1	0.22	0.055
Saloum	<i>Dentex canariensis</i>	demersal	Dc 4-4	276	291	11.859	-16.405	in	1	0.232	0.058
Saloum	<i>Dentex canariensis</i>	demersal	Dc 3-4	240	196	12.736	-16.262	in	1	0.158	0.04
Saloum	<i>Dentex canariensis</i>	demersal	Dc 5-4	252	220	11.979	-16.24	in	1	0.122	0.03
Saloum	<i>Dicologoglossa hexophthalma</i>	demersal	Dh 2-4	200	100	11.236	-14.892	in	2	0.363	0.091
Saloum	<i>Dicologoglossa hexophthalma</i>	demersal	Dh 1-4	178	73	11.358	-14.882	in	2	0.226	0.056
Saloum	<i>Dicologoglossa hexophthalma</i>	demersal	Dh 3-4	184	82	11.008	-14.878	in	2	0.408	0.102
Saloum	<i>Dicologoglossa hexophthalma</i>	demersal	Dh 5-4	186	84	11.32	-14.876	in	2	0.198	0.049
Saloum	<i>Dicologoglossa hexophthalma</i>	demersal	Dh 4-4	200	97	11.153	-14.577	in	2	0.893	0.223
Saloum	<i>Plectorhinchus mediterraneus</i>	demersal	Pm 2-4	304	415	12.755	-15.446	in	2	0.547	0.137
Saloum	<i>Plectorhinchus mediterraneus</i>	demersal	Pm 3-4	294	377	12.934	-15.341	in	2	0.391	0.098
Saloum	<i>Plectorhinchus mediterraneus</i>	demersal	Pm 4-4	302	393	12.453	-15.26	in	2	0.52	0.13
Saloum	<i>Plectorhinchus mediterraneus</i>	demersal	Pm 1-4	275	285	12.418	-15.243	in	2	0.217	0.054
Saloum	<i>Plectorhinchus mediterraneus</i>	demersal	Pm 5-4	300	411	12.702	-15.228	in	2	0.659	0.165
Saloum	<i>Pseudupeneus prayensis</i>	demersal	Pp 3-4	199	102	11.443	-17.34	in	2	0.139	0.035

Saloum	<i>Pseudupeneus prayensis</i>	demersal	Pp 5-4	225	135	11.739	-17.325	in	2	0.669	0.167
Saloum	<i>Pseudupeneus prayensis</i>	demersal	Pp1-4	220	128	12.159	-17.258	in	2	0.936	0.234
Saloum	<i>Pseudupeneus prayensis</i>	demersal	Pp 4-4	222	132	12.068	-16.601	in	1	0.137	0.034
Saloum	<i>Pseudupeneus prayensis</i>	demersal	Pp 2-4	205	107.93	12.077	-16.105	in	1	0.264	0.066
Saloum	<i>Sphoeroides spengleri</i>	demersal	Ss 1-4	125	34	11.635	-16.05	in	1	0.228	0.057
Saloum	<i>Sphoeroides spengleri</i>	demersal	Ss 5-4	121	35	12.853	-15.734	in	2	0.102	0.025
Saloum	<i>Sphoeroides spengleri</i>	demersal	Ss 2-4	130	32	10.35	-15.497	in	2	0.133	0.033
Saloum	<i>Sphoeroides spengleri</i>	demersal	Ss 3-4	129	37	10.503	-14.979	in	2	0.082	0.02
Saloum	<i>Trachurus trecae</i>	benthopelagic	Tt 10-4	232	131	10.621	-16.308	in	1	0.094	0.023
Saloum	<i>Trachurus trecae</i>	benthopelagic	Tt 7-4	238	125	10.864	-16.272	in	1	0.098	0.024
Saloum	<i>Trachurus trecae</i>	benthopelagic	Tt 6-4	219	110	10.932	-16.149	in	1	0.063	0.016
Saloum	<i>Trachurus trecae</i>	benthopelagic	Tt 9-4	265	184	11.187	-16.149	in	1	0.121	0.03
Saloum	<i>Trachurus trecae</i>	benthopelagic	Tt 8-4	246	138	11.079	-14.881	in	2	0.059	0.015
Saloum	<i>Umbrina canariensis</i>	demersal	Uc 1-4	226	132	10.997	-16.274	off	1	0.077	0.019
Saloum	<i>Umbrina canariensis</i>	demersal	Uc 3-4	243	168	11.516	-16.092	off	1	0.17	0.042
Saloum	<i>Umbrina canariensis</i>	demersal	Uc 2-4	221	135	11.594	-15.961	off	1	0.059	0.015
Saloum	<i>Umbrina canariensis</i>	demersal	Uc 5-4	222	142	11.645	-15.916	off	2	0.054	0.014
Saloum	<i>Umbrina canariensis</i>	demersal	Uc 4-4	237	162	11.634	-15.697	off	2	0.067	0.017

**Table 5 Summary of the different ecological parameters measured on fish from different sampling sites.**





## Variabilité et déterminants de la bioaccumulation des métaux par les poissons marins - Cas du courant des Canaries

Le Grand Ecosystème Marin du Courant des Canaries est un des principaux systèmes mondiaux d'upwelling et assure une des plus importantes productions de pêche parmi les grands écosystèmes marins d'Afrique. Cet écosystème est soumis à des apports en éléments métalliques entraînant leur accumulation par les organismes marins et notamment les poissons. En termes de bioaccumulation, une forte variabilité est observée entre les espèces exploitées mais également entre individus d'une même espèce. Ce travail de thèse se propose de caractériser les paramètres majeurs qui déterminent l'accumulation des métaux par les poissons marins, en prenant pour cas d'étude l'écosystème du courant des Canaries. Deux approches ont été adoptées, l'une portant sur les particularités physiologiques et l'autre sur les mécanismes écologiques régissant la bioaccumulation. A un premier niveau d'intégration, les caractéristiques physiologiques spécifiques telles que l'efficacité d'assimilation, les concentrations en métallothionéines et le mode de séquestration des métaux agissent sur la bioaccumulation. Ensuite, à un second niveau, la nature des proies joue un rôle crucial sur l'exposition aux métaux du fait de la dominance de la voie de transfert trophique chez les poissons marins. A un dernier niveau d'intégration, l'habitat représente un paramètre déterminant, principalement en influant sur les niveaux de contamination des proies soumis au cycle des métaux dans l'environnement marin. Cette thèse a présenté une approche innovante, en proposant une étude intégrée de la cellule à l'écosystème en passant par l'individu, dédiée à la compréhension d'un mécanisme impliquant des répercussions tant sur la préservation des ressources marines que sur la santé des consommateurs.

**Mots-clés** | Eléments métalliques | Poissons marins | Répartition subcellulaire | Cinétiques d'accumulation | Ecologie trophique

---

## Variability and determinants of metal bioaccumulation by marine fish – Case study of the Canary current

The Canary Current Large Marine Ecosystem in West Africa is one of the most productive upwelling ecosystems. It is subjected to anthropogenic inputs leading to metal accumulation by marine fish species, which show a great variability in terms of metal concentrations. This PhD work aims to characterize the major parameters determining metal accumulation by marine fish, based on the case study of the Canary current. Two main approaches were developed concerning physiological and ecological features. At a first integration level, physiological characteristics such as assimilation efficiency, metallothionein concentrations and subcellular metal partitioning influence bioaccumulation. At a second level, prey composition plays a key role due to the dominance of metal accumulation through dietary intakes in marine fish. Finally, habitat drives metal exposure to fish due to the biogeochemical cycle of the metal elements. This study proposed an innovating approach, combining analyses from the cellular level to the ecosystem one, including the individual level, and aiming for a thorough comprehension of a mechanism implying consequences on marine resource conservation and human safety.

**Keywords** | Metal elements | Marine fish | Subcellular partitioning | Accumulation kinetics | Trophic ecology