



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Discipline ou spécialité :

Biogéochimie Isotopique

Présentée et soutenue par :

Masbou Jérémy

le : mercredi 22 octobre 2014

Titre :

Étude des processus métaboliques, écologiques et biogéochimiques
contrôlant le fractionnement isotopique du Hg chez les mammifères marins
de l'Arctique

Ecole doctorale :

Sciences de l'Univers, de l'Environnement et de l'Espace (SDU2E)

Unité de recherche :

Géosciences Environnement Toulouse

Directeur(s) de Thèse :

David Point et Jeroen E. Sonke

Rapporteurs :

Aurélien Dommergue – Maître de conférences, LGGE, Grenoble

Vincent Balter – Directeur de Recherche CNRS, ENS, Lyon

Membre(s) du jury :

Yves Cherel – Directeur de Recherche CNRS, CEBC, Chizé (Examineur)

Gwenaél Imfeld – Chargé de recherche CNRS, LHYGES, Strasbourg (Examineur)

Jérôme Viers – Professeur des universités, GET, Toulouse (Examineur)

Jean-Luc Rols – Professeur des universités, ECOLAB, Toulouse (Président)

Résumé

Depuis la découverte de processus de dépôts massifs de Hg (AMDE), l'Arctique est devenue une région clé dans la compréhension du cycle global du Hg. L'impact sur la santé humaine de ce polluant dépend non seulement de sa concentration mais aussi et surtout de sa forme chimique. En particulier, le monométhylmercure (MMHg) est une puissante neurotoxine qui atteint des concentrations élevées chez les prédateurs de l'Arctique du fait de ses propriétés de bioaccumulation et de bioamplification dans la chaîne alimentaire. La compréhension des mécanismes à l'origine de la formation du MMHg (méthylation) et de sa dégradation (déméthylation) est primordiale pour caractériser son devenir et son impact dans les milieux aquatiques. Nous présentons ici une étude environnementale effectuée sur des tissus biologiques prélevés sur trois espèces emblématiques de l'Arctique : le phoque annelé (*Pusa hispida*), la baleine beluga (*Delphinapterus leucas*) et l'ours polaire (*Ursus Maritimus*). L'analyse de leurs compositions isotopiques en Hg montre simultanément un fractionnement dépendant (MDF, $\delta^{202}\text{Hg}$) et indépendant de la masse (MIF, $\Delta^{199}\text{Hg}$). Alors que les variations en $\delta^{202}\text{Hg}$ semblent largement expliquées par des processus métaboliques internes de détoxification/accumulation, la tendance temporelle (1988-2002, *Pusa hispida*) et le gradient latitudinal (60°N-71°N, *Delphinapterus leucas*) observés pour le $\Delta^{199}\text{Hg}$ reflètent vraisemblablement l'influence de l'évolution et de la distribution de la banquise sur le cycle biogéochimique du Hg en Arctique. Dans la seconde partie de cette thèse de doctorat, nous développons une approche moléculaire novatrice et prometteuse permettant de déterminer pour la première fois la composition isotopique des atomes de Hg et de carbone contenus dans la molécule de MMHg pour les échantillons biologiques. Ces premières mesures offrent des perspectives prometteuses pour tracer l'origine du MMHg dans les milieux aquatiques.

Abstract

Since the discovery of atmospheric Hg depletion events (AMDE) in the Arctic, the Polar Regions have become key in understanding the Hg global cycle. The impact of Hg on human health depends on both Hg concentration and chemical form. In particular, monomethylmercury (MMHg) is a potent neurotoxin. High MMHg concentrations are observed in Arctic top predators due to bioaccumulation and biomagnification processes in the food webs. Hence, the characterization of the transformations leading to the formation (methylation) and the degradation (demethylation) of MMHg is of great concern to assess its fate and impact in aquatic ecosystems. In this context, we present an environmental study on three Arctic bio-indicators: the ringed seal (*Pusa hispida*), the beluga whale (*Delphinapterus leucas*) and the polar bear (*Ursus maritimus*). Hg isotope analysis of the bio-indicator liver tissues show both mass dependent isotope fractionation (MDF, $\delta^{202}\text{Hg}$) and mass independent fractionation (MIF, $\Delta^{199}\text{Hg}$). While the changes in $\delta^{202}\text{Hg}$ are widely linked to in vivo metabolic processes, the time trend (1988-2002, *Pusa hispida*) and the latitudinal gradient (60°N-71°N, *Delphinapterus leucas*) observed for $\Delta^{199}\text{Hg}$ signatures suggests the influence of sea ice cover on the Arctic biogeochemical Hg cycle. In a second part of this dissertation, we propose a novel and promising molecular approach with the first measurements of the isotopic compositions of Hg and carbon on the MMHg molecule in biological samples. These results are very promising for tracing MMHg origin in aquatic environments.

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mes deux directeurs de thèse, David Point et Jeroen Sonke pour m'avoir dans un premier temps fait confiance puis soutenu tout le long de cette thèse. Merci de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur des thématiques si variées, cela m'a enrichi énormément. Merci David pour l'accueil en Bolivie et pour les souvenirs uniques que j'en garde. Merci Jeroen pour les discussions, tes conseils toujours pertinents et ton indulgence vis-à-vis de mon anglais...

Merci à Paul Becker de nous avoir confié des échantillons uniques de beluga, d'ours ou de phoques sur lesquels on a pu s'amuser analytiquement et qui nous donnent maintenant du fil à retordre en ce qui concerne leur interprétation.

Un merci particulier à Christelle, Sylvaine, Priscia et Jérôme Viers qui m'ont mis le pied à l'étrier et m'ont permis de rentrer de la meilleure des façons dans ce monde de la Recherche.

Un énorme merci aux personnels techniques des salles blanches et de chimie, que j'ai sollicité un nombre incalculable de fois sans qu'ils ne me témoignent quelque trace de lassitude que ce soit. Je pense en particulier à Manu, Jonathan, Fred, Jérôme, Aurélie, Carole, Philippe et Stéphanie.

Merci également à Pierre Richard, Gaël Guillou et Benoit Lebreton pour leur accueil chaleureux lors de mes nombreuses visites au LIENNs de La Rochelle. Je remercie aussi Vincent Perrot, Sylvain Bérail et David Amouroux pour leur disponibilité et leur accueil lors de mes escapades analytiques au laboratoire du LCABIE à Pau.

Merci aux collègues de l'équipe Hg ou non avec qui on a partagé plus qu'un boulot. Merci Lars, Ruoyu, Tristan, Max, Xuewu, Nicolas, Angela, Mélanie, Adrien, Jean-Louis, Thomas...

Merci à mes amis toulousains thésards ou non avec qui j'ai partagé de belles aventures. Merci Manu, Alison, Camille, Sophie, Irina, Fix, Jean, Fabien, Julie, Elsa, Marion, Clélia et tous ceux que j'oublie. Un remerciement spécial pour la fine équipe tourangelle avec qui l'amitié dure malgré la distance. Merci Repier, Alison, Léo, Benjam, Laurence, Simon, Mathieu, Rémi...

Pour finir, mes remerciements vont surtout à ma famille. Mes parents qui m'ont soutenu pendant toutes ces années d'études et qui m'ont toujours encouragé à continuer et faire de mon mieux. Merci à la fratrie Fred, Seb et Delphine d'avoir été là pendant les vacances/week end pour se ressourcer. Sans oublier Cindy, Mélanie, Lou et Gabin.

Merci à tous...

Sommaire

Résumé	I
Abstract	II
Remerciements	III
Sommaire.....	IV
Liste des abréviations et symboles	VI
Introduction générale.....	2
Contexte.....	2
Objectifs de la thèse.....	6
Chapitre 1. Cycle biogéochimique du Hg : cas de l’Océan Arctique.....	8
1.1. Toxicité du Hg.....	8
1.1.1. Introduction	8
1.1.2. Toxicité et voies d’expositions des différentes formes du Hg.....	9
1.1.3. RéglementationS/Recommandations.....	11
1.1.4. Etudes cliniques chez les populations Inuits	13
1.2. Le Hg, un polluant à l’échelle globale.....	15
1.2.1. Quelles sources de Hg en Arctique ? Bilans de masse	15
1.2.2. Les sources atmosphériques de Hg.....	16
1.2.3. Autres sources du Hg en Arctique.....	19
1.3. Hg : de la source à sa consommation	20
1.3.1. Un phénomène unique aux pôles : les AMDEs.....	20
1.3.2. Processus contrôlant la spéciation du Hg en milieu aquatique.....	21
1.3.3. Passage du Hg abiotique en Hg biotique	28
Chapitre 2. Les isotopes stables du Hg.....	34
2.1. Théorie du fractionnement isotopique.....	35
2.1.1. Détermination de fractionnements isotopiques	36
2.1.2. Mécanismes théoriques à l’origine de MDF.....	38
2.1.3. Mécanismes théoriques à l’origine du MIF	40
2.2. Fractionnements isotopiques dans l’environnement.....	47

2.2.1. Mécanismes et réactions à l'origine de fractionnements isotopiques.....	47
2.2.2. Etudes environnementales des isotopes du Hg.....	54
2.2.3. Etudes chez les organismes aquatiques	58
2.2.4. Cas de l'Arctique.....	62
2.2.5. Conclusions sur les isotopes du Hg et contribution de la thèse	64
Chapitre 3. Présentation de l'étude et des bioindicateurs	67
3.1. Description de la zone d'étude/échantillonnage.....	67
3.2. Description des bioindicateurs	68
3.2.1. Définition d'un bioindicateur	68
3.2.2. Etude de biomonitoring-Hg chez le phoque annelé (<i>Phoca hispida</i>).....	69
3.2.3. Etude de biomonitoring-Hg chez la baleine beluga (<i>Delphinapterus leucas</i>).....	70
3.2.4. Etude de biomonitoring-Hg chez l'ours polaire (<i>Ursus Maritimus</i>).....	72
3.2.5. Possibles limites à l'étude des bioindicateurs.....	72
3.3. Analyses effectuées sur les bioindicateurs	76
3.3.1. Techniques analytiques classiques (BSIA).....	76
3.3.2. Techniques analytiques nouvelles (CSIA).....	79
Chapitre 4. La tendance temporelle des compositions isotopiques du Hg chez les phoques annelés, reflet de la fonte de la couverture de glace en Alaska.....	83
Chapitre 5. Variation des signatures isotopiques en Hg dans les foies de mammifères marins de l'Alaska	122
Chapitre 6. L'étude de la composition isotopique des différentes formes chimiques du mercure dans les tissus de mammifères aquatiques permet d'établir le lien entre l'exposition au méthylmercure et la réponse métabolique.....	154
Chapitre 7. Article publié dans <i>Journal of Analytical Atomic Spectrometry</i> : Application d'une méthode d'extraction sélective pour l'analyse isotopique spécifique du méthylmercure (MeHg-CSIA) dans les matériaux biologiques.....	188
Chapitre 8. Détermination du $\delta^{13}\text{C}$ sur la molécule de méthylmercure par chromatographie gazeuse-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS)	200
Conclusions et perspectives.....	229
Références bibliographiques	235
Annexes	252

Liste des abréviations et symboles

AFS	Atomic-Fluorescence Spectrometry
AMAP	Arctic Monitoring and Assessment Programme
AMDE	Atmospheric Mercury Depletion Events
AMMTAP	Alaska Marine Mammal Tissue Archival Project
BSIA	Bulk Stable Isotope Analysis
CV	Cold Vapor
CSIA	Compound Specific Isotope Analysis
DMA	Direct Mercury Analyser
DOC/DOM	Dissolved Organic Carbon/Matter
GC	Chromatographie Gazeuse
GEM	Gaseous Elemental Mercury Hg(0)
GET	Laboratoire Géosciences Environnement Toulouse
IRMS	Isotope Ratio Mass Spectrometer
LCABIE	Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement (Pau, France)
LIENSs	Laboratoire Littoral ENvironnement et Sociétés (La Rochelle, France)
RGM	Reactive Gaseous Mercury Hg(II)
Hg	Mercure/Mercury
HgT	Fraction Totale du Hg
MC-ICPMS	Multi-Collector Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
MDF	Mass dependent fractionation / Fractionnement Dépendant de la Masse
MIE	Magnetic Isotope Effect
MIF	Mass Independent Fractionation / Fractionnement Indépendant de la Masse
MeHg	Méthylmercure
MMHg	Monométhylmercure
DMHg	Diméthylmercure
NIST	National Institute of Standard and Technology
NVE	Nuclear Volume Effect
ODE	Ozone Depletion Event
PK	Pharmacokinetics
SD/SE	Déviation / Erreur Standard
SEE	Self Shielding Effect
SEM	Selective Extraction Method
SRB	Bactérie Sulfato-Réductrice

Introduction générale

Introduction générale

Contexte

Le mercure (Hg) est un élément naturel omniprésent dans l'environnement. Le mercure transite entre les réservoirs géochimiques et biologiques via les processus biogéochimiques naturels. Jusqu'à récemment, les processus de libération du Hg étaient généralement en équilibre avec les processus naturels conduisant à son stockage (Amos et al., 2013). Certaines activités anthropiques modifient fortement cet équilibre en extrayant des matériaux fossiles contenant du mercure de la Terre et en les volatilisant par combustion par exemple. Au fil du temps, et surtout depuis la révolution industrielle, ces types d'activités industrielles ont mobilisé d'énormes quantités de mercure les faisant passer d'une forme inerte dans la croûte continentale à une forme disponible et réactive dans l'atmosphère. Cette réactivité lui permet de se redistribuer dans les différents compartiments de l'environnement (sols de surface, atmosphère, lacs, rivières, océans). Ainsi, la présence du mercure (Hg) dans l'environnement a considérablement augmenté durant les deux derniers siècles (Dietz et al., 2009; Pirrone and Mason, 2009).

L'impact du Hg sur la santé dépend non seulement de sa concentration mais surtout de sa forme chimique. Le mercure existe sous de très nombreuses formes chimiques dans l'environnement que l'on peut regrouper en 3 catégories : le Hg élémentaire (Hg^0), le mercure inorganique divalent (Hg^{2+}) souvent associé à d'autres éléments/contre-ions (Cl^- , OH^- , S^{2-} etc...) et le Hg organique dont les deux principales formes sont le mono-méthylmercure (MMHg) et le diméthylmercure (DMHg). Bien que l'exposition élevée ou répétée à différentes formes de mercure puisse avoir des conséquences graves sur la santé, sa forme organique, le MMHg, a révélé des effets irréversibles sur le système nerveux (Grandjean et al., 1997). De nombreuses études se sont focalisées sur ce composé pour comprendre les mécanismes de sa formation, de son assimilation biologique et de sa dégradation (Hintelmann, 2009). Alors que les conditions et les mécanismes de sa formation sont encore très méconnus, son devenir est mieux contraint. Le MMHg une fois formé est directement assimilable et accumulé par les organismes vivants (Mason et al., 1996). Il peut s'accumuler au sein d'un même organisme, on parle alors de processus de bioaccumulation (Mason et al., 1995a), et voir sa concentration augmenter entre les niveaux trophiques des chaînes alimentaires, on parle alors de processus de bioamplification (Atwell et al., 1998). Ces propriétés ont permis d'expliquer i) le fait que certains poissons et crustacés présentent des concentrations de cent à un million de fois supérieures à l'eau environnante (Mason et al., 1995a), et ii) le fait que certains prédateurs terminaux présentent des concentrations extrêmes largement supérieures aux limites de consommations conseillées ($0,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) par la World Health Organization (Lailson-Brito et al., 2012; WHO, 1990). L'Homme fait partie de ces prédateurs terminaux et des études menées sur des populations de différentes régions du monde ont

révélé de fortes concentrations dans les cheveux ou le sang accompagnées de divers troubles neurologiques. En particulier, les peuples, d'Amazonie (Malm, 1998), d'Arctique (Butler Walker et al., 2006), du Japon (Tsubaki and Irukayama, 1977) ou des îles Faeroe (Grandjean et al., 1995) sont des populations à risque du fait de leur régime alimentaire centré essentiellement sur la consommation de poisson. Pour les populations d'Arctique, il est clair que cette contamination extrême est reliée à leur consommation élevée de prédateurs terminaux, en particulier de nombreuses espèces de mammifères marins, comme les phoques et les baleines qui présentent des concentrations en Hg supérieures aux seuils recommandés (Ponce et al.; Tian et al., 2011). S'ajoutant à la longue liste des substances retrouvées en Arctique (notamment les polluants organiques persistants, POPs), les fortes concentrations en Hg rencontrées dans les chaînes alimentaires, ainsi que chez l'homme font de cette région une priorité dans l'étude du cycle du mercure (Letcher et al., 2010).

Alors que les sources anthropogéniques locales sont quasiment inexistantes en Arctique, les premières hypothèses évoquées pour expliquer les fortes concentrations rencontrées dans les chaînes trophiques Arctiques ont impliqué le cycle du mercure atmosphérique. Sa présence dans l'atmosphère sous forme volatile (Hg^0) et sa longue durée de vie ($\approx 0,5\text{-}1$ an, (Pacyna et al., 2006)) lui permettent d'être transporté via les courants atmosphériques sur de très longues distances (Outridge et al., 2008). À la fin des hivers polaires de l'Arctique un phénomène unique connu sous le nom d'«Atmospheric Mercury Depletion Events» (AMDEs) converti massivement le Hg^0 en Hg^{2+} dans l'atmosphère Arctique (Schroeder and Munthe, 1998). Ces dépôts ont pour conséquence de produire un apport massif de Hg^{2+} réactif dans l'écosystème Arctique au début de la saison de forte production primaire. Il est probable que ces conditions de fonte de la cryosphère au printemps libèrent du Hg inorganique suffisamment labile pour être méthylé. Il reste à savoir quelle fraction de mercure réactif est convertie en méthylmercure bio-disponible (Larose et al., 2011), et dans quel compartiment et à quelle interface la méthylation a lieu (Harris et al., 2010). La compréhension du cycle du mercure dans cette région représente un vrai challenge analytique et scientifique en considérant que le phénomène d'AMDE ne peut pas à lui seul expliquer les fortes concentrations observées dans la chaîne trophique (Heimbürger et al., 2013). Les variations spatiales et temporelles importantes des concentrations en Hg observées chez les espèces sentinelles largement distribuées aux latitudes Arctiques posent la question des processus et des sources affectant le Hg dans cet environnement extrême (Rigét et al., 2011). Alors que le poids relatif du Hg d'origine anthropogénique par rapport aux sources naturelles de ces dernières décennies a été suspecté (Dietz et al., 2009; Outridge et al., 2009), de nombreux rapports suggèrent l'existence d'un système plus complexe possiblement lié à des contraintes climatiques, dont l'effet n'est pas connu (AMAP, 2011; Gaden et al., 2009; Rigét et al., 2012). La variabilité de la couverture de glace a récemment été évoquée pour expliquer les variations géographiques et temporelles des concentrations en Hg observées chez différentes espèces bio-indicatrices (Dietz et al., 2009; Gaden et al., 2009). En contexte de changement climatique, la rapide disparition de cette

interface physique entre l'océan et l'atmosphère connue pour influencer les échanges de Hg et sa dégradation/méthylation (AMAP, 2011; Point et al., 2011) représente une des hypothèses qui sera étudiée dans cette thèse.

La récente amélioration des techniques analytiques, notamment la spectrométrie de masse à plasma inductif à multi-collection (MC-ICPMS), a permis de quantifier la proportion de chaque isotope d'un élément dans un échantillon (Johnson et al., 2004). Grâce à des propriétés physico-chimiques particulières (différents états d'oxydation, changement de phase), le Hg présente des variations de composition isotopique larges ($\approx 10\%$) par rapport aux éléments lourds de numéros atomiques similaires. Rapidement de nombreuses études ont été menées en laboratoire pour comprendre les mécanismes de fractionnement isotopique du Hg (photoréduction, évaporation, oxydation, méthylation, déméthylation) mais aussi dans des échantillons naturels (Bergquist and Blum, 2007; Bergquist and Blum, 2009; Das et al., 2013; Estrade et al., 2009; Foucher et al., 2013; Hintelmann and Lu, 2003; Kritee et al., 2013; Sonke, 2011; Zheng and Hintelmann, 2009). Le Hg est un des trois éléments sur Terre, avec l'oxygène et le soufre, présentant à la fois un fractionnement dépendant de la masse (MDF) et indépendant de la masse (MIF). Alors que le MDF du Hg a été observé lors de nombreuses réactions chimiques et biologiques (Bergquist and Blum, 2009; Yin et al., 2010), le MIF sur les isotopes impairs est lié essentiellement à la photo-réduction du Hg inorganique et à la photodéméthylation aquatique du MMHg en présence de matière organique dissoute (Bergquist and Blum, 2007; Zheng and Hintelmann, 2009). Ainsi de nombreuses études environnementales se sont servies de cette exclusivité pour tracer et quantifier cette réaction via l'amplitude de MIF mesuré dans des échantillons biologiques (Bergquist and Blum, 2007; Blum et al., 2013b; Point et al., 2011). Suivant cette stratégie, une étude réalisée par notre groupe de recherche en 2011 a montré l'influence de la couverture de glace sur la photochimie marine du Hg, et ceci par l'intermédiaire de l'étude des signatures isotopiques du Hg intégrées dans des œufs d'oiseaux marins prélevés en Alaska suivant un gradient latitudinal (Point et al., 2011). En supplément des outils analytiques classiques, l'analyse des isotopes du Hg offre une approche prometteuse pour tracer des mécanismes de transfert et transformation ou des sources de Hg aussi bien à l'échelle locale que globale (Sonke, 2011; Yin et al., 2010).

Alors que la mesure des isotopes du Hg s'effectuait jusqu'à présent uniquement sur la fraction totale du Hg, les récentes avancées analytiques ont permis de déterminer la signature isotopique des différentes formes chimiques (MMHg et Hg inorganique (Epov et al., 2010; Epov et al., 2008)). L'approche moléculaire de ces analyses nouvelles appelées « compound-specific isotope analysis » (CSIA) font l'objet d'un fort intérêt de la communauté scientifique, particulièrement dans le domaine de l'écologie dont les applications de l'étude de composition isotopique des acides aminés (N) et des lipides (C)-CSIA (Jochmann and Schmidt, 2012). Depuis que le lien entre le cycle du C et du Hg ait été démontré dans de nombreuses études expérimentales (Ravichandran, 2004; Zheng and Hintelmann,

2009) et environnementales (Day et al., 2012; Senn et al., 2010), il apparaît indispensable de développer ces techniques et ouvrir la voie aux études isotopiques croisées. La molécule de CH_3Hg (MMHg) comportant à la fois un atome de Hg (Hg-CSIA) et un atome de carbone (C-CSIA) est une candidate idéale pour la mesure «double isotopie» du C/Hg à l'échelle moléculaire. Ce développement unique effectué lors de cette thèse de doctorat pourrait permettre de mieux tracer et déconvoluer les sources de mercure et de carbone pour tracer les origines de la méthylation aquatique du Hg inorganique, et ainsi répondre à l'une des plus grandes questions posée par la communauté scientifique du Hg.

Objectifs de la thèse

Les objectifs de cette thèse peuvent se décomposer en deux parties :

- La première partie s'appuie sur des résultats préliminaires obtenus par notre groupe (Point et al., 2011) sur l'utilisation des isotopes du Hg mesurés dans des œufs de Guillemots (*Uria aalge*, *Uria lomvia*) pour tracer l'influence de la couverture de glace sur la photochimie marine du Hg. L'objectif de cette thèse de doctorat est de mieux comprendre et caractériser ce phénomène en développant une étude plus globale de l'écosystème. Il s'agit en particulier de mesurer les isotopes du Hg dans les tissus d'autres espèces de bioindicateurs (phoque annelé, baleine beluga et ours polaire) collectés dans différentes régions de l'Arctique ainsi qu'au travers des séries temporelles d'archives cryogéniques de tissus biologiques. Cette stratégie doit nous permettre de répondre aux questions suivantes :
 - L'analyse d'une série temporelle de bioindicateurs permet-elle de détecter un changement dans le cycle du Hg lié à la fonte de la couverture de glace ?
 - Les variations isotopiques de Hg mesurées dans les tissus biologiques sont-elles d'origine interne métabolique, écologique (liés aux différentes stratégies de recherche de nourriture), ou sont-elles plutôt géochimiques pouvant alors représenter des marqueurs géographiques d'habitat ?
 - Enfin, l'analyse des isotopes du Hg dans des échantillons de chaîne trophique nous permet-elle une meilleure compréhension du cycle du Hg en Arctique ?
- La deuxième partie est ciblée sur une contribution analytique forte à l'état de l'art de la métrologie du mercure afin de disposer de nouveaux outils pour étudier son cycle biogéochimique et écologique. Il s'agit en particulier de faire évoluer le niveau d'échelle à laquelle sont réalisées les analyses de composition isotopique. Actuellement l'analyse de la composition isotopique en Hg se fait essentiellement à l'échelle élémentaire, c'est à dire au niveau des concentrations totales en Hg contenues dans un échantillon. Dans le cadre de cette thèse, les développements analytiques ont porté sur l'analyse isotopique à l'échelle moléculaire sur la molécule de MMHg en réalisant une double caractérisation isotopique des atomes de mercure (MC-ICP-MS) et carbone (GC-IR-MS).

Chapitre 1.

Cycle biogéochimique du Hg : Cas de l'Océan Arctique

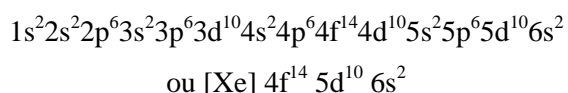
Chapitre 1. Cycle biogéochimique du Hg : cas de l'Océan Arctique

1.1. Toxicité du Hg

1.1.1. Introduction

1.1.1.1. Brève présentation physico-chimique du Hg

La température de fusion extrêmement faible du Hg ($T_{\text{fusion}} = -38,829^{\circ}\text{C}$) lui confère la particularité d'être le seul métal liquide à température et pression ambiante. Dans la classification périodique, le Hg fait partie des métaux et est apparenté au zinc et au cadmium. Son numéro atomique (Z) est de 80 et sa masse atomique moyenne de $200,59 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Sa configuration électronique est :



Il possède trois états d'oxydation : 0, +I et +II dont les deux derniers lui permettent de former des liaisons chimiques. A l'état métallique, l'énergie requise pour transférer un électron de la couche 6 (i.e. transfert $6s^2 \rightarrow 6s^1 p^1$) est très élevée ($524,26 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) ce qui explique la faible réactivité et le caractère inerte du Hg^0 . Les électrons de la couche d se délocalisent dans le réseau métallique de Hg et ceci induit son état liquide. C'est aussi le seul métal dont la température d'ébullition soit inférieure à 900K ($T_{\text{eb}}(\text{Hg}) = 630\text{K}$ sous 1 atm). Métal gris-blanc, de masse volumique $13\,546 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ à 293 K, le mercure est très volatil (pression de vapeur saturante égale à 0.180 Pa à 293K) et ses vapeurs sont, avec les gaz nobles, les seules vapeurs monoatomiques.

1.1.1.2. Historique

Leonard Goldwater a publié un historique détaillé sur les nombreuses utilisations du mercure et de ses composés par d'anciennes civilisations (Goldwater, 1972). Brièvement, il y évoque son utilisation probable par les Chinois pour préparer l'encre rouge il y a plus de 3000 ans mais aussi dans les tombes égyptiennes, peut-être comme conservateur ou peut-être comme un protecteur contre les mauvais esprits. La connaissance de la toxicité du Hg remonte au moins au premier siècle de notre ère lorsque le savant romain Pline décrit l'empoisonnement au mercure comme une maladie d'esclaves travaillant dans les mines contaminées. Au XIX^{ème} siècle, l'utilisation du Hg liquide par les fabricants de chapeaux anglais leur provoquait de graves symptômes neurologiques (dépression, tremblements, troubles de l'élocution...). Plus récemment, les études sur le Hg se sont intensifiées depuis les premiers accidents écologiques industriels comme la dramatique intoxication en 1953 de villageois de la Baie de Minamata au Japon. Elle s'est déroulée suite à la consommation de poissons et coquillages

contaminés au méthylmercure après des rejets de déchets d'une usine de production de chlorure de vinyle. Les poissons présentaient des concentrations en Hg entre 5,61 et 37,5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (seuil généralement autorisé $\approx 0,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, (WHO, 1990) (Harada, 1995)). Dans les cheveux des habitants environnant les concentrations pouvaient atteindre 705 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (seuil considéré comme « à risque » $\approx 30 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, (Legrand et al., 2010)) provoquant des symptômes sévères allant jusqu'à la mort supposée d'un millier de personnes (Harada, 1995). Le même scénario s'est produit à Niigata le long du fleuve Agano en 1964-1965 (Tsubaki and Irukayama, 1977). Plusieurs séries d'intoxications à partir de farines issues de graines traitées par des organo-mercuriels se sont produites en Irak en 1956, en 1960 et en 1971-1972 (Bakir et al., 1973) et au Guatemala (Ordóñez et al., 1966).

Actuellement, toute personne est exposée à un certain niveau de mercure. La plupart le sont à des niveaux très bas, souvent via une exposition chronique. Cependant, certaines personnes sont exposées à de hauts niveaux de mercure, le plus souvent lors de temps d'expositions courts. Ainsi les facteurs déterminants dans l'évaluation de la sévérité de l'exposition sont :

- La forme de mercure concernée
- La dose
- L'âge de la personne exposée (cas particulier du fœtus)
- La durée de l'exposition (chronique, ponctuelle)
- La voie d'exposition (inhalation, ingestion ou contact dermique)

La toxicité du mercure dépend de sa forme chimique. Les voies d'expositions et les symptômes sont assez différents lors d'une exposition au composé élémentaire, aux composés inorganiques ou aux composés organiques du mercure.

1.1.2. Toxicité et voies d'expositions des différentes formes du Hg

1.1.2.1. Hg élémentaire

Le mercure métallique ou élémentaire Hg^0 est liquide à la température ambiante et est peu absorbé dans le tractus gastro-intestinal (0,01%, (Goyer and Clarkson, 1996)). Ainsi, l'ingestion de mercure liquide métallique ne semble pas être toxique en soi (Goldwater, 1972). Cependant, sa pression de vapeur saturante élevée (13,2 $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$ à 20 °C) mène à sa vaporisation et à un équilibre dans l'air pouvant atteindre des concentrations 130 fois supérieures à la limite industrielle conseillée de 0,1 $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$ (Hu, 2000). Si la vapeur est inhalée, Hg^0 traverse facilement (80%, (Ozuah, 2000)) les membranes des alvéoles pulmonaires et entre dans le système circulatoire. Il est liposoluble et peut alors se fixer sur les globules rouges, mais aussi le système nerveux central et les reins (Clarkson, 1997). Le mercure élémentaire absorbé est rapidement oxydé en Hg^{2+} via le complexe catalase- H_2O_2 . Parce que le Hg^{2+} peut aussi être réduit en Hg^0 , un cycle d'oxydation-réduction du mercure dans le

corps peut se produire (Eisler, 2010). L'excrétion de Hg^0 s'effectue via l'air exhalé, les urines, les fèces, la transpiration et la salive (Keating et al., 1997). Un temps de demi-vie d'environ 58 jours est documenté dans le corps humain (Keating et al., 1997).

Typiquement, un empoisonnement ponctuel élevé aux vapeurs de Hg^0 entraîne une sévère bronchite ou bronchiolite durant les heures suivantes (Satoh, 1994). Lorsqu'il est absorbé en petites quantités régulières pendant un certain temps, c'est le cas des expositions chroniques, Hg^0 peut provoquer des défaillances du système nerveux central (SNC). C'est un type de contamination que l'on retrouve en contexte minier ou industriel (Lauwerys et al., 1990) lors des procédures de chauffage utilisé pour l'extraction des minerais tels que le cinabre ou lors du chauffage des amalgames or-mercure (orpaillage) (ATSDR, 1999). Il a aussi été montré que les amalgames dentaires (Hg 50%, Ag/Sn/Cu 50%) utilisés en dentisterie depuis 150 ans pouvait émettre de façon chronique du Hg^0 . Un amalgame dentaire d'une surface de $0,4 \text{ cm}^2$ libère $15 \mu\text{g Hg}\cdot\text{jour}^{-1}$ par usure mécanique, évaporation et dilution dans la salive (Gross and Harrison, 1989). Il semble donc aujourd'hui admis que les amalgames dentaires soient la première cause d'absorption de mercure devant le poisson, les produits de la mer ($2,3 \mu\text{g}\cdot\text{jour}^{-1}$, MMHg) ou l'eau ($0,3 \mu\text{g}\cdot\text{jour}^{-1}$, Hg inorganique) d'après la « World Health Organization ». Cependant les formes de mercure sont différentes et le risque sur la santé lié à la présence de Hg^0 dans les amalgames dentaires est faible comparé aux autres sources (notamment MMHg) détaillées ci-dessous.

1.1.2.2. Hg inorganique

Si l'ingestion de Hg^0 liquide présente un risque limité, l'ingestion de sels de mercure (Hg^{2+} et Hg^+) peut causer des défaillances rénales sévères pouvant aller jusqu'à la mort pour une dose comprise entre 1 et 4 g (ATSDR, 1999). Un des sels les plus importants est le Hg_2Cl_2 ou calomel utilisé durant de nombreuses années comme antibactérien, antiseptique ou diurétique. Actuellement, l'exposition se fait principalement *in-vivo* lors de l'oxydation de composés métalliques (Hg^0) ou organiques (MMHg) du mercure dans le foie (Suda and Hirayama, 1992). Sous la forme Hg^{2+} , il possède de grandes affinités pour les protéines soufrées et les lipides contenus dans les divers organes et donc se retrouve en concentrations plus importantes au niveau des reins, du foie et du système nerveux central (Eisler, 2010). Il a aussi été observé que Hg^{2+} pouvait traverser le placenta et se concentrer dans le fœtus chez la femme enceinte (Kuhnert et al., 1981; Vahter et al., 2000).

Une administration directe de HgCl_2 chez le rat a montré qu'une grande partie était rapidement exhalée ($\approx 90\%$) limitant sa toxicité pour l'organisme. Les 10% absorbés ont un temps de demi-vie de 49-96 jours dans le corps et sont extrêmement irritant pour le tractus gastro-intestinal (Hall et al., 1995). Les effets toxiques du mercure inorganique sont dépendant des complexes associés notamment des groupes fonctionnels sulfhydriles (-SH) présents chez de nombreuses enzymes importantes. En

règle générale, une exposition ponctuelle peut engendrer des troubles digestifs et des lésions rénales alors qu'une exposition chronique implique principalement le système nerveux central causant des dommages permanents (Boadi et al., 1992; Hu, 2000).

1.1.2.3. Hg organique

En ce qui concerne le Hg organique, les deux espèces dominantes dans l'environnement sont le mono et le diméthyl-mercure (MMHg, DMHg). Cependant le MMHg est la forme prédominante du Hg organique dans l'environnement et son extrême toxicité est connue depuis des décennies (Sager et al., 1984). C'est la principale source d'exposition au mercure pour l'Homme car elle se fait via l'alimentation, en particulier par les poissons où 90 à 100% du Hg présent dans le muscle est sous forme de MMHg (Bloom, 1992). Une fois ingéré l'absorption intestinale du MMHg est très efficace et on le retrouve rapidement dans le sang ou il s'associe à des groupes sulfhydriles, particulièrement avec la cystéine (Berlin et al., 1986). Typiquement la concentration dans le sang atteint un maximum dans les 4 à 14 heures après ingestion (WHO, 2008). Il subit ensuite une clairance vers les autres tissus où il peut être stocké plus durablement. Un équilibre entre le sang et les différents organes est observé au bout de 4 jours après exposition (Kershaw et al., 1980). Le MMHg est liposoluble et peut traverser facilement la barrière sang-cerveau et celle du placenta. En particulier la barrière sang-cerveau est incomplète durant la première année de vie chez l'humain et le MMHg peut la traverser durant cette période (Rodier, 1995). Ainsi l'exposition prénatale ou postnatale au MMHg affecte le système nerveux central et peut être particulièrement dramatique au cours du développement du cerveau (Albers et al., 1988; Choi et al., 1978). Ensuite le MMHg inhibe in-vitro la formation de microtubules et la synthèse des protéines dans les neurones, ce qui perturbe la synthèse de l'ADN (Goyer and Clarkson, 1996). Dans les cellules il inhibe la mitose et interfère avec la migration neuronale (Goyer and Clarkson, 1996). Due à cette plus grande pénétration dans le cerveau, les syndromes générés par une intoxication au MMHg sont à doses égales plus sévères que ceux observés pour Hg^{2+} et Hg^0 (Norton, 1986). L'exposition à des niveaux élevés de MMHg peut provoquer un retard mental, une paralysie cérébrale, des convulsions et finalement la mort (WHO, 1990). Le MMHg est éliminé très lentement dans les selles, les phanères (ongles, cheveux, poils) et l'urine. La durée de demi-vie du MMHg dans le corps humain est d'environ 70 jours (52-93 jours, (Keating et al., 1997)).

1.1.3. RéglementationS/Recommandations

Parce que la consommation de poisson est la principale source de contamination en MMHg, de nombreux gouvernements délivrent des recommandations, des directives, ou des limites légales au sujet des concentrations maximales de Hg et/ou de MMHg présents dans les poissons destinés à la consommation. Ces concentrations sont résumées dans la Table 1 (et de façon plus complète dans les Annexes, Table S1).

Table 1 : Exemple de limites ou recommandations mises à jour pour les concentrations en Hg (déterminées sur poids humide) dans les poissons de différents pays. Modifié et mis à jour de ((UNEP), 2002). Table plus complète disponible en Annexes (Table S1).

Pays/ Organisation	Type de poisson	Maximum recommandé (sur poids humide)	Contrôles	Niveau d'ingestion tolérable
Australie	Prédateurs Autres espèces de poissons et de crustacés et de mollusques	1,0 mg _{HgT} /kg 0,5 mg _{HgT} /kg	“The Australian Food Standards Code”	Dose hebdomadaire tolérable: 2,8 mg Hg.kg ⁻¹ de poids corporel par semaine pour les femmes enceintes.
Canada	Poissons hors prédateurs Limite maximale autorisée pour les personnes qui consomment de grandes quantités de poissons, comme les Autochtones	0,5 mg _{HgT} /kg 0,2 mg _{HgT} /kg	“Guidelines/ Tolerances of Various Chemical Contaminants in Canada”	Dose journalière tolérable: 0,47 µg Hg.kg ⁻¹ de poids corporel par jour pour la plupart de la population et 0,2 µg Hg.kg ⁻¹ de poids corporel par jour pour les femmes en âge de procréer et les jeunes enfants
Chine	Poissons d'eau douce	0,3 mg _{HgT} /kg	“Sanitation standards for food”	
Communauté Européenne	Produits de la pêche, à l'exception de ceux qui sont énumérés ci-dessous. (voir Annexes pour liste prédateurs)	0,5 mg _{HgT} /kg 1 mg _{HgT} /kg	Différentes décisions de la Commission, des règlements et des directives	
Japon	Tous poissons	0,4 mg _{HgT} /kg 0,3 mg _{MMHg} /kg	“Food Sanitation Law - Provisional regulatory standard for fish and shellfish”	Dose tolérable hebdomadaire: 0,17 mg méthylHg (0,4 mg.kg ⁻¹ de poids corporel par jour(Nakagawa et al., 1997)
Grande Bretagne	Tous poissons	0,3 mg _{HgT} /kg	“European Statutory Standard”	
Etats-Unis	Poissons, crustacés et autres animaux aquatiques Localement dépend des états	1 mg _{MMHg} /kg 0,5 mg _{MMHg} /kg	“FDA action level” Contrôles locaux	US EPA reference dose: 0.1 µg methylHg.kg ⁻¹ de poids corporel par jour
WHO/FAO	Tous les poissons hors prédateurs	0,5 mg _{MMHg} /kg	“FAO/WHO Codex Alimentarius guideline level”	Dose hebdomadaire tolérable provisoire: 3,3 µg methylHg.kg ⁻¹ de poids corporel par semaine

Chez l'Homme le niveau de contamination peut être déterminé par l'analyse de différents tissus (cheveux, sang, urines, ongles...). Typiquement l'analyse de Hg dans le sang permet d'identifier une exposition récente alors que les cheveux enregistrent une exposition à plus long terme. La « WHO » considère que la concentration moyenne « normale » pour une population ne consommant pas ou peu de poisson doit être comprise entre 5 et 10 µg.L⁻¹ dans le sang (WHO, 2008). Le « National Research Council Canada » (NRCC) a placé cette même moyenne à 2 µg.L⁻¹ (NRCC, 2000). Différents niveaux de contaminations ont été déterminés allant de niveau « acceptable » à niveau « à risque » et sont résumés dans la Table 2.

Table 2 : Exemples de concentrations limites ou recommandées de Hg dans le sang, urines ou cheveux. Modifié de (Bose-O'Reilly et al., 2010).

Seuils	Hg dans le sang ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Hg dans les urines ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Hg dans les urines ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ajusté à la créatinine)	Hg dans les cheveux ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)
Seuils de bio-monitoring humains (Ewers et al., 1999)				
HBM I (niveau d'alerte)	5	7	5	—
HBM II (niveau d'action)	15	25	20	—
Seuils fixés par « Health Canada's First Nation and Inuit Health Branch » chez les adultes (Legrand et al., 2010)				
Niveau "acceptable"	20	—	—	6
Niveau "à risque modéré"	20-100	—	—	—
Niveau "à risque"	>100	—	—	>30
Cas particulier des femmes enceintes, seuil « acceptable »	<8	—	—	—
US EPA. Niveau de référence	5.8	—	—	1,4 (0,1*)

* dose journalière en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de poids corporel/jour

1.1.4. Etudes cliniques chez les populations Inuits

Les peuples Inuits ont été largement étudiés depuis plusieurs décennies et le maintien du style de vie traditionnel vis à vis de la nourriture fait d'eux des populations considérées comme « à risques » (Van Oostdam et al., 2005). La nourriture traditionnelle est composée d'espèces situées en bout de chaîne alimentaire comme les phoques, les belugas et les narvals dont les concentrations en Hg, bien que variant selon les organes/tissus, sont élevées (Table 3). Les concentrations de mercure les plus élevées ont été trouvées chez des Inuits du Groenland où des concentrations sanguines peuvent atteindre $53 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Ces niveaux sont largement supérieurs aux valeurs seuils fixées par l'EPA ($5,8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ou Health Canada (niveau « acceptable » = $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). La Figure 1 résume la proportion des femmes en âge de procréer vivant dans différentes régions d'Arctique dont la concentration en HgT dépasse ces deux seuils conseillés. On observe que 19% des femmes Inuits en Alaska dépassent le seuil de $5,8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Ce pourcentage varie entre 5,6 et 32% pour les femmes Inuits dans le nord du Canada. Il se situe entre 20 et 98 % pour les femmes Inuits du Groenland et entre 1,5 à 12% pour les femmes du nord de la Russie.

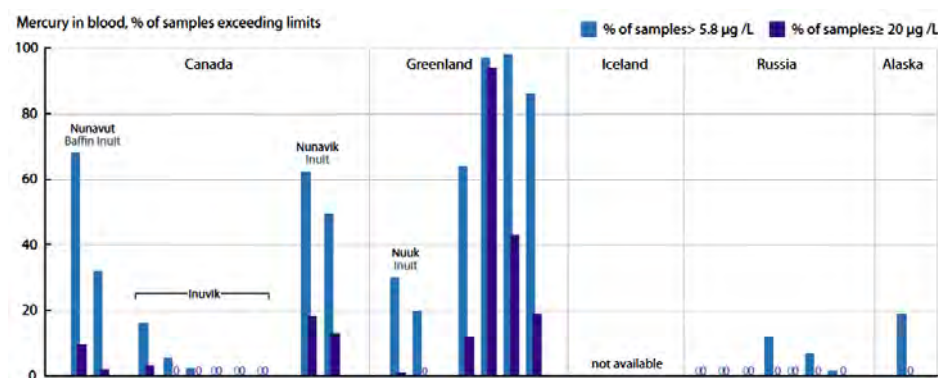


Figure 1 : Pourcentage de mères ou femmes en âge de procréer dont la concentration totale en Hg dans le sang dépasse les valeurs conseillées. D'après (Hansen and Van Oostdam, 2009).

Plus inquiétantes encore sont les concentrations observées dans le sang du cordon ombilical de femmes enceintes du nord du Québec qui atteignent en moyenne $22,7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ contre $12,6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ dans le sang maternel (Muckle and Ayotte, 2001). Comme expliqué auparavant, la perméabilité de la membrane sang-cerveaux chez le fœtus/enfant fait que l'exposition au Hg dans cette période présente un risque majeur pour le neuro-développement (Albers et al., 1988; Choi et al., 1978). Des données supplémentaires obtenues par Tian et al. en 2011 ont montré une moyenne de $0,66 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de Hg dans les cheveux d'enfants de 3 à 5 ans à Nunavut (Canada, (Tian et al., 2011)). Ils ont ensuite associé ces concentrations aux principaux aliments consommés et ont déterminé un «top 10 des contributeurs en Hg» qui est présenté Table 3. On observe que les viandes de belugas et de phoques annelés, espèces considérées dans cette thèse, sont présentes 6 fois dans ce « top 10 » et représentent à elles deux plus de 50% de l'exposition totale en Hg.

Table 3 : Top 10 des contributeurs en Hg chez les principaux plats consommés de façon journalière chez les population de Nunavut, Canada (Tian et al., 2011).

Nourriture	Ingestion journalière de nourriture ($\text{g}\cdot\text{jour}^{-1}$)	Proportion de l'ingestion totale (%)	[HgT] nourriture ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ poids sec)	Ingestion journalière de Hg ($\mu\text{g}\cdot\text{jour}^{-1}$)	Rang	Proportion de l'exposition totale (%)
« Muktuk » de belugas	12.95	12.44	0.42	5.43	1	33.37
« Muktuk » de narvals	8.95	8.60	0.47	4.22	2	25.90
Foie de phoques annelés	0.23	0.22	10.47	2.39	3	14.71
Poisson	13.04	12.53	0.13	1.73	4	10.60
Viande de Caribou	31.14	29.92	0.03	0.98	5	6.02
Viande de phoques annelés	5.75	5.52	0.13	0.75	6	4.59
Canard	0.55	0.53	0.39	0.22	7	1.32
Viande de belugas	0.52	0.50	0.35	0.18	8	1.11
Huile de belugas	0.35	0.34	0.21	0.07	9	0.45
Graisse de belugas	0.26	0.25	0.21	0.06	10	0.35
Total	73.75	70.85	–	16.03	–	98.43

1.2. Le Hg, un polluant à l'échelle globale

1.2.1. Quelles sources de Hg en Arctique ? Bilans de masse

Les écosystèmes polaires sont souvent considérés comme les derniers écosystèmes vierges sur Terre. L'Arctique, par exemple, est faiblement peuplé et présente très peu d'activité industrielle (excepté certaines régions dans l'Arctique Russe (Bard, 1999) et les mines au Svalbard). Cependant le mercure fait partie de ces contaminants dont la redistribution est globale, due notamment à un long temps de résidence dans l'atmosphère (0,5-1 an, (Pacyna et al., 2006)). Le transport atmosphérique sur de longues distances porte les contaminants des latitudes moyennes vers les régions polaires (Figure 2, (Bard, 1999; Outridge et al., 2008)), ce qui contrarie fortement ce statut de zone « préservée ».



Figure 2 : Principales voies de transport (vents, rivières, océans) du Hg en Arctique. D'après (Macdonald et al., 2005).

Alors que l'Arctique a été longtemps considéré comme un puits de mercure (Ariya et al., 2004), certaines études récentes évoquent un système plus complexe (Dastoor and Durnford, 2013). Grâce à sa particularité d'océan semi-fermé limitant les échanges avec les océans Atlantiques et Pacifiques, des études de modélisation de bilan de masses de mercure ciblées sur la région Arctique ont vu le jour (Figure 3).

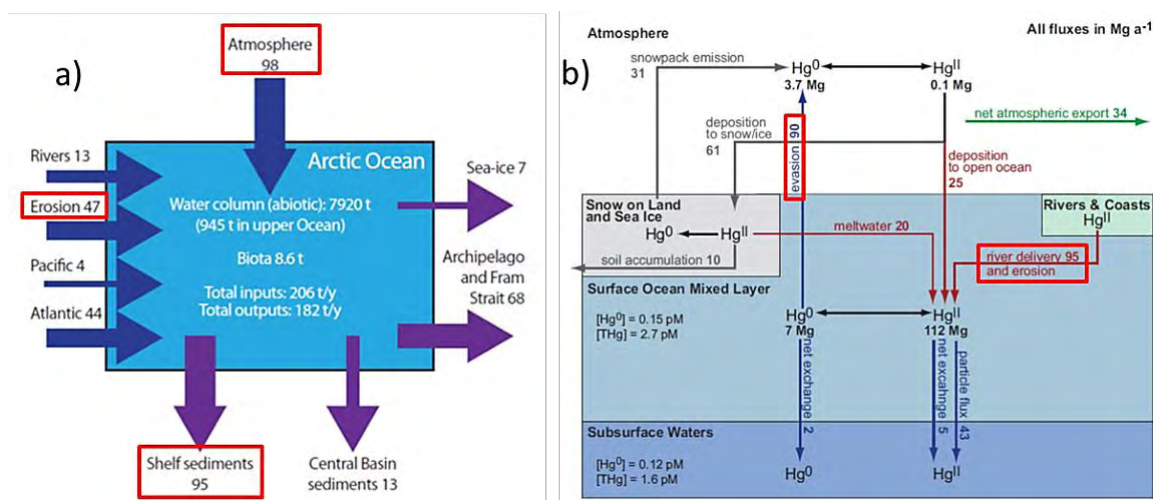


Figure 3 : a) Modèle de bilan de masse du mercure total dans l'Océan Arctique. Les flèches représentent les flux en $t.an^{-1}$. D'après (Outridge et al., 2008). b) Budget annuel du mercure (Hg^0 et Hg^{2+}) dans les différents compartiments d'Arctique établie par le modèle GEOS-Chem (Fisher et al., 2012).

Outridge et al. (2008) suggèrent que les deux principales sources de Hg sont les dépôts atmosphériques ($98 Mg.an^{-1}$) et l'érosion côtière ($47 Mg.an^{-1}$, Figure 3a, (Outridge et al., 2008)). Le principal puits serait les sédiments ($95 Mg.an^{-1}$) pour un bilan de masse négatif de $24 t.an^{-1}$ illustrant la thèse du puits de mercure pour l'Arctique. Dans une étude de modélisation plus sophistiquée (modèle 3D GEOS-Chem), Fisher et al. (2012) ont estimé que les rivières sont les principales sources de Hg ($80 Mg.an^{-1}$) suivi de l'atmosphère ($45 Mg.an^{-1}$) et de l'érosion côtière ($15 Mg.an^{-1}$, Figure 3b, (Fisher et al., 2012)). Ils montrent aussi dans cette étude que l'évasion du Hg à la surface de l'Océan ($90 Mg.an^{-1}$) et la sédimentation des particules ($43 Mg.an^{-1}$) sont les principales voies de sorties du Hg de la surface de l'Océan. Le bilan de masse global de 0 indique que l'Arctique ne serait ni un puits ni une source de Hg.

Ces deux études sont très exploratoires et montrent que la réalisation de bilan de masse du Hg en Arctique est actuellement très méconnue et sujette à caution. D'autres études du même type et qui sont basées sur des mesures sur le terrain de la spéciation du Hg (notamment dans la colonne d'eau) devraient permettre de contraindre mieux ce système complexe.

1.2.2. Les sources atmosphériques de Hg

D'après Outridge et al. (2008) la principale source de Hg en Arctique serait les dépôts atmosphériques. Ainsi, le mercure présent en Arctique proviendrait essentiellement de sources situées hors de la région via les courants atmosphériques (Figure 2). De nombreuses sources naturelles créent, depuis bien avant l'apparition de l'homme, un bruit de fond environnemental. Depuis l'essor de

l'activité humaine, ce bruit de fond créé par les sources naturelles a été fortement modifié avec l'apparition des apports anthropogéniques.

1.2.2.1. Les sources naturelles

Les émissions naturelles primaires consistent en la libération directe du Hg présent dans la croûte continentale. Elles sont essentiellement générées par les éruptions volcaniques (Pyle and Mather, 2003), les activités géothermales (Varekamp and Buseck, 1986) ou l'érosion des sols/roches enrichis en Hg (Nriagu, 1989). Une estimation de Pirrone et al. (2010) fait état de 5207 Mg.an⁻¹ de mercure rejeté dans l'atmosphère via les sources naturelles détaillées dans la Table 4 (Pirrone et al., 2010). D'autres estimations des émissions naturelles ou préindustrielles font état de 2000-3700 Mg.an⁻¹, contribuant à un tiers des émissions globales (Selin et al., 2008; Sunderland and Mason, 2007).

Table 4: Emissions globales de Hg via les sources naturelles estimées en 2008. D'après (Pirrone et al., 2010).

Source	Mercury (Mgyr ⁻¹)	Contribution (%)
Oceans	2682	52
Lakes	96	2
Forests	342	7
Tundra/Grassland/Savannah/ Prairie/Chaparral	448	9
Desert/Metalliferous/Non-vegetated Zones	546	10
Agricultural areas	128	2
Evasion after mercury depletion events	200	4
Biomass burning	675	13
Volcanoes and geothermal areas	90	2
TOTAL	5207	100

D'autre part, les eaux naturelles sont souvent super-saturées en Hg⁰ (Morel et al., 1998), ainsi la surface des océans est une grande source naturelle de Hg⁰ pour l'atmosphère (52% des sources naturelles d'après (Pirrone et al., 2010)). Il est probable que ce type d'émission concerne du Hg d'origine anthropogénique et on parle alors de réémissions. Ainsi, le mercure préalablement déposé de l'atmosphère sur les sols, les eaux de surface et la végétation peut être réduit en Hg⁰ par différents processus naturels (photo-réduction, feux de forêts...) et réémis de nouveau vers l'atmosphère. Par ces processus, le mercure peut être déposé et réémis indéfiniment dans l'environnement. En plus d'être difficile à quantifier, il est difficile de définir l'origine du Hg mais cette source est souvent classée dans les sources naturelles. Deux études font état de 2500 à 4100 Mg.an⁻¹ de Hg réémis à l'échelle globale (Selin et al., 2008; Sunderland and Mason, 2007), ce qui représente actuellement la principale

source de Hg dans l'atmosphère. Un rapport de l'UNEP estime que les réémissions pourraient générer actuellement environ 60% des émissions totales de mercure dans l'air (UNEP, 2013).

1.2.2.2. Sources anthropogéniques

Le mercure transite naturellement à travers les réservoirs géochimiques mais les activités humaines telles que l'exploitation minière et, plus récemment, la combustion de combustibles fossiles (pétrole, charbon) ont augmenté le flux de Hg à partir du réservoir minéral en profondeur vers l'atmosphère. Bien que ces matériaux fossiles ne contiennent du Hg qu'à l'état de traces (Pavlish et al., 2003), leur combustion en continue et à grande échelle semble actuellement dominer les apports atmosphériques mondiaux (Fitzgerald et al., 1998; Lamborg et al., 2002). Leur contribution dans les émissions anthropogéniques a été récemment estimée à 35-45% (Pacyna et al., 2010; Pirrone et al., 2010). Actuellement, les centrales à charbon sont les sources ponctuelles les plus importantes de mercure rejeté dans l'atmosphère. Toutefois d'autres sources d'émissions incluant l'exploitation minière artisanale de l'or, la fonte/production de métaux (fer, acier, cuivre, zinc) ou la production de ciment constituent également une contribution importante au budget atmosphérique mondial (Figure 4a, (Pacyna et al., 2010; Pirrone et al., 2010; Streets et al., 2011)). Aussi, il est fort probable que nous héritons aussi des émissions produites entre 1860 et 1920 lors des différentes ruées vers l'or où les quantités de Hg émis ont été considérables (jusqu'à 2.5 Gg.an⁻¹, (Streets et al., 2011)). La même étude fait état de 350 Gg de Hg émis de tout temps par l'activité humaine, dont 61% émis après 1850 (Streets et al., 2011).

Dans le monde la carte des émissions anthropogéniques révèle de fortes disparités géographiques (Figure 4b). Alors que les émissions dans les « pays industrialisés » comme l'Europe ou l'Amérique du Nord ont fortement baissées grâce à la mise en place d'une législation de réduction des émissions, cette baisse a été largement compensée et même inversée par l'augmentation des émissions dans les ex-pays « en développement » notamment en Asie où la combustion du charbon a fortement augmentée (AMAP, 2011). Actuellement les émissions anthropogéniques ont été estimées à ≈2000 Mg.an⁻¹ (Pacyna et al., 2010; Pirrone et al., 2010; Streets et al., 2011), ce qui, comparé aux 2000-3700 Mg.an⁻¹ estimés pour les émissions naturelles, contribue de 35 à 50% dans les émissions globales.

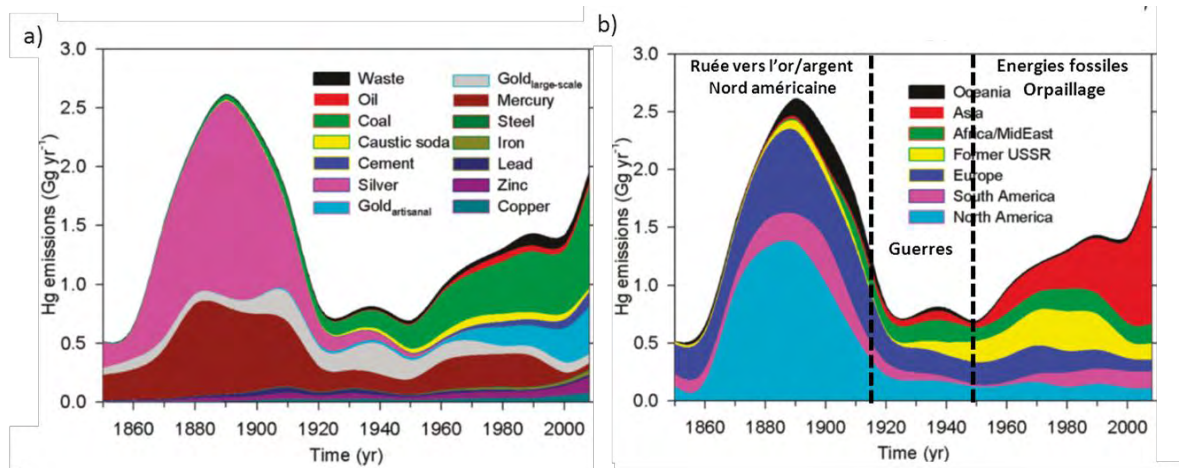


Figure 4 : Estimation et attribution des différentes émissions en Hg depuis 1850 a) par type et b) par région. D'après (Streets et al., 2011).

1.2.3. Autres sources du Hg en Arctique

On distingue quelques sources locales en Arctique lors du transfert de Hg à partir des roches, des sols, des sédiments ou de la végétation dans les systèmes aquatiques par les processus de volatilisation, des feux, des poussières ou la re-suspension sédimentaire. Les études les plus poussées ont été effectuées sur les apports de Hg dans la mer de Beaufort via la rivière de Mackenzie et dans la mer de Béring par la rivière Yukon. Il a été estimé que la rivière Mackenzie exporte en moyenne 1200-2900 kg.an⁻¹ de HgT et 7-22 kg.an⁻¹ de MMHg (Leitch et al., 2007). Les récentes modélisations de Fischer et al. (2012) ont suggéré que les rivières étaient des sources de Hg largement sous-estimées et qu'il était indispensable de les considérer notamment en contexte de changements climatiques (Figure 3b, (Fisher et al., 2012)). En effet, il a été montré que le flux de mercure de la rivière Mackenzie (Hg particulaire) augmente proportionnellement avec son débit (Leitch et al., 2007), et ce dernier a augmenté d'un taux de 0.6 km³.an⁻¹ lors des 35 dernières années (Peterson et al., 2002). Cette augmentation, s'ajoutant à celles observées dans les rivières Russes ($\approx 7\%$, (Peterson and Baringer, 2009)), pourrait être à l'origine d'une augmentation du flux de Hg entrant dans l'océan Arctique. Des nouvelles mesures du flux de Hg des rivières russes sont nécessaires pour (in)valider le modèle de Fischer et al. (2012).

1.3. Hg : de la source à sa consommation

1.3.1. Un phénomène unique aux pôles : les AMDEs

Contrairement au Hg⁰ gazeux (GEM) dont la réactivité est limitée, les formes oxydées du Hg (« reactive gaseous mercury » (RGM)) sont très réactives, voyagent sur de plus courtes distances et se déposent rapidement une fois formées (Holmes et al., 2009; Lindberg et al., 2007). La compréhension de la formation du RGM dans l'atmosphère est l'une des principales clefs pour comprendre comment le Hg atmosphérique entre dans les environnements terrestres ou océaniques. Des mesures en continu sur le terrain ont montré une chute du GEM accompagnée par un pic de RGM au printemps polaire (Figure 5). Ces observations ont été attribuées à des processus très rapides (de l'heure à la journée) transformant massivement le GEM en RGM dans l'atmosphère Arctique (Steffen et al., 2008). Ce phénomène appelé AMDEs a été observé pour la première fois par Schroeder et al. (1998) (Schroeder and Munthe, 1998). Il a été ensuite confirmé par de nombreuses études en Arctique, sub-Arctique et sur les côtes Antarctiques (Berg et al., 2003; Ebinghaus et al., 2002; Lindberg et al., 2001; Poissant and Pilote, 2003; Steffen et al., 2005).

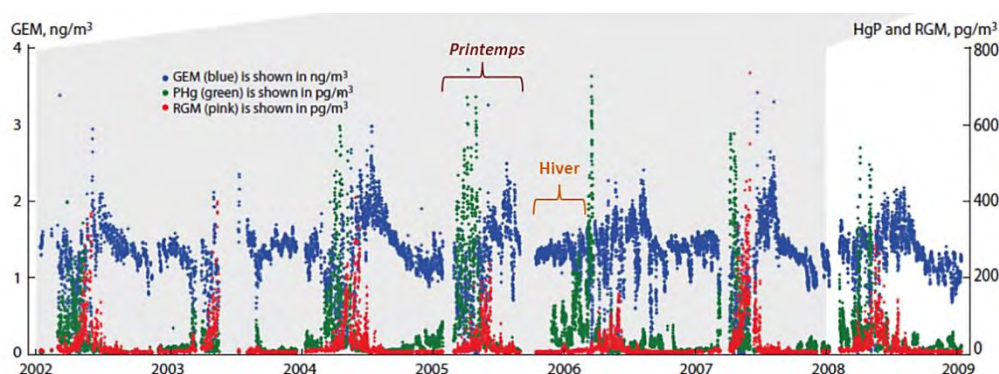


Figure 5 : Série temporelle des concentrations atmosphériques en Hg gazeux (GEM, bleu), Hg particulaire (PHg, vert) et Hg gazeux réactif (RGM, rouge) à Alert (Nunavut, Canada). D'après (AMAP, 2011).

La mesure simultanée d'autres composés a permis de montrer que cette chute en GEM était accompagnée d'une chute des concentrations en ozone atmosphérique (Lindberg et al., 2002; Schroeder and Munthe, 1998). La réactivité du Hg⁰ avec certains oxydants atmosphériques (O₃, OH, Cl, Br et NO₃) a été étudiée en laboratoire et résumée dans plusieurs reviews (Ariya et al., 2008; Simpson et al., 2007; Steffen et al., 2008). Il est peu probable que le Hg⁰ réagisse rapidement avec O₃. Des études antérieures ont montré une série unique de réactions impliquant l'ozone et certains composés halogénés (notamment BrO_x, Br, BrO) qui menaient à la destruction de l'ozone (« ozone depletion Events » (ODEs), (Simpson et al., 2007)). La corrélation entre les ODEs et les AMDEs a fait naître l'hypothèse que BrO_x oxyde le GEM en RGM qui se dépose rapidement sur les surfaces

enneigées (Schroeder and Munthe, 1998). Les AMDEs ont été observées uniquement au printemps, la fonte de la glace et plus particulièrement des cheveux de glace (« frost flowers) pourraient délivrer une source massive d'aérosols halogénés à cette période (Lindberg et al., 2002; Rankin et al., 2000; Simpson et al., 2007).

La réaction d'oxydation du Hg^0 en Hg^{2+} semble se décomposer en deux étapes. La première partie considère la chimie des halogènes pour expliquer les chutes dans les concentrations en ozone (Barrie et al., 1988). Selon des études théoriques (Goodsite et al., 2004; Shepler et al., 2007), il apparaît que la réaction initiale implique Hg^0 et Br débouchant sur la formation d'un intermédiaire excité pouvant se décomposer mais aussi donner un composé gazeux stable contenant Hg^{2+} (e.g HgBr_2). Avec un temps de vie réduit dans l'atmosphère (quelques heures à quelques jours (Holmes et al., 2009)) le HgBr_2 se dépose rapidement par dépôts secs et humides provoquant les AMDEs.

Possibles effets du changement climatique sur les AMDEs

Un changement de température peut avoir un effet sur l'une ou l'autre (ou les deux) série de réactions (dégradation de l'ozone ou oxydation de Hg^0) et engendrer un effet sur les AMDEs. Des expérimentations ont été menées en laboratoire sur l'oxydation de Hg^0 à température ambiante (20°C, (Ariya et al., 2002)) et au-dessus (Greig et al., 1970). Ces expérimentations n'ont pas démontré de dépendance à la température mais des études similaires à des températures polaires manquent. Parallèlement, des calculs théoriques ont montré que de nombreuses réactions d'oxydation du Hg étaient supérieures à basses températures (Goodsite et al., 2004). Ainsi une augmentation de la température, à une concentration en Br constante, pourrait ralentir l'oxydation du Hg^0 et donc son dépôt. Ensuite, une hausse de la température pourrait entraîner une augmentation de la glace annuelle et des « frost flowers » riches en sels marins et en halogènes (BrO , (Simpson et al., 2007)). Actuellement, il est impossible de quantifier et de savoir lequel de ces deux mécanismes va dominer. Connaissant le rôle important des AMDEs dans l'apport de Hg à l'océan Arctique (Fisher et al., 2012; Outridge et al., 2008), des expériences sur l'influence de la température en laboratoire et sur le terrain devraient être conduites rapidement.

1.3.2. Processus contrôlant la spéciation du Hg en milieu aquatique

1.3.2.1. Oxydation vs Réduction

Une fois déposé (par AMDEs par exemple), le Hg^{2+} retourne majoritairement dans l'atmosphère via photo-réduction en Hg^0 (50-80%, (Dommergue et al., 2003; Ferrari et al., 2008; Lalonde et al., 2002)). L'autre partie peut rejoindre le compartiment océanique où il peut subir différentes transformations. Des processus redox vont alors contrôler l'équilibre entre les deux états d'oxydations 0 et 2 ; l'état d'oxydation de 1 existe mais est très rare dans l'environnement. Le

potentiel de réduction standard $E^0=0.85$ V pour le couple Hg^0/Hg^{2+} est à l'origine du cycle dynamique de réduction et d'oxydation dans les compartiments atmosphériques/aquatiques (Kozin and Hansen, 2013).

De nombreux mécanismes de réduction du Hg^{2+} ont été découverts. Des bactéries résistantes possédant l'opéron *mer* sont capables de réduire Hg^{2+} en Hg^0 via l'enzyme *merA* (Barkay et al., 2003) alors que d'autres le font via la *cytochrome c oxydase* (Sugio et al., 2001). Cependant, les processus de réduction dans les milieux aquatiques sont dominés par la photo-réduction abiotique de Hg^{2+} en Hg^0 ou photo-déméthylation du $MMHg^+$ en Hg^0 qui peut se volatiliser (Ferrara et al., 2003; Whalin et al., 2007). Des techniques d'incubations sous différents rayonnements lumineux permettent d'estimer les taux de réaction (Zhang, 2006). Il en ressort que le processus de photo-réduction est favorisé par l'intensité lumineuse apportée mais aussi par la présence de carbone organique dissous (COD), de O_2 dissous et de Fe(III) (Zhang and Lindberg, 2001). Pour contrer ce phénomène le principal processus d'oxydation du Hg^0 en Hg^{2+} se situe à la fois au niveau et sous l'interface eau/atmosphère (Sheu and Mason, 2004). L'oxydation aqueuse du Hg^0 requiert la présence d'oxydant comme l'ozone, des radicaux hydroxyles (Munthe, 1992; Seigneur et al., 1994), d'halogènes (Lindberg et al., 2002) ou de bactéries hydroperoxydases (Smith et al., 1998). Dans les océans les processus d'oxydation diminuent l'évasion du Hg^0 par réduction (Mason and Sheu, 2002; Selin, 2009; Zhang and Hsu-Kim, 2010). Whalin et Mason (2006) ont montré qu'en l'absence de lumière le taux d'oxydation de Hg^0 égalait celui de réduction de Hg^{2+} dans des eaux côtières filtrées pour atteindre un équilibre en quelques heures (Whalin and Mason, 2006).

Les réactions redox sont primordiales car elles contrôlent la biodisponibilité du Hg en contrôlant sa spéciation et les possibles liaisons avec différents ligands (Morel et al., 1998). Bien que le ratio $Hg^{2+}/MMHg$ soit grand ($MMHg=2-35\%$ du mercure total dans les océans, (Selin, 2009)), l'équilibre entre réduction/oxydation influence la quantité de Hg^{2+} disponible sa méthylation en $MMHg$ ou $DMHg$.

1.3.2.2. Méthylation

La méthylation est la réaction à l'origine de la production du $MMHg$, composé neurotoxique et bioassimilable, à partir de Hg inorganique (Hg^{2+}), composé nettement moins toxique et peu-assimilable. La recherche sur la méthylation du Hg a été initiée à la fin des années 1960 après l'incident de Minamata au Japon où des milliers de personnes furent empoisonnées par des poissons contaminés en $MMHg$ alors que les rejets concernaient initialement du mercure inorganique. Une grande incompréhension suivit, soulevant plusieurs questions : par quoi/par qui/comment/où se produit la méthylation du mercure inorganique ?

Méthylation abiotique

Très peu d'études ont été réalisées sur les processus de méthylation abiotique dus à leurs supposés moindre importance dans le budget global de méthylation. Une méthylation purement chimique du Hg inorganique est possible seulement si les donneurs de groupements méthyl sont présents avec une efficacité dépendante des conditions physico-chimiques du milieu (pH, salinité, force ionique, concentrations). Ces donneurs peuvent être des petites molécules organiques comme le méthyl-iode, diméthylsulfide mais aussi des composés organiques plus volumineux contenus dans la matière organique dissoute (DOM) comme les acides fulviques ou humiques (Celo et al., 2006). Les réactions de transméthylation impliquant la méthylcobalamine ou d'autres organo-métalliques ont aussi été observées (Celo et al., 2006).

Méthylation biotique

Alors que la production de MMHg dans les systèmes terrestres est supposée négligeable (Hintelmann, 2009), les environnements aquatiques sont des sites importants de méthylation de Hg inorganique, particulièrement dans les zones anaérobies. En 1969, peu après la catastrophe de Minamata, la transformation du mercure inorganique en MMHg par des micro-organismes dans les sédiments a été suggérée pour la première fois par Jensen et Jernelov (JENSEN and Jernelöv, 1969). Les bactéries sulfato-réductrices (SRB) ont été pour la première fois mises en cause dans la méthylation du Hg inorganique dans les sédiments par Compeau et al. (1985) (Compeau and Bartha, 1985). En fait, ils ont trouvé que la méthylation dans les sédiments salés anoxiques marins diminuait de 95% en présence de molybdate de sodium. Ils ont isolé une souche de SRB, *Desulfovibrio desulfuricans* dans les sédiments et ont trouvé qu'elle « méthylait » fortement le Hg inorganique. Depuis, les SRB ont été proposées comme bactéries dominantes dans la méthylation du Hg dans une grande variété d'écosystèmes aquatiques où il a été observé une inhibition de molybdate de sodium (Achá et al., 2011; Cleckner et al., 1999). D'autres micro-organismes, comme les bactéries réductrices du Fer ou méthanogènes, ont aussi montré des capacités plus restreintes de méthylation du Hg. Récemment, une avancée considérable dans la compréhension de la méthylation biotique a été effectuée avec la preuve de la présence de deux gènes (*hgcA* et *hgcB*) localisés dans toutes les souches de bactéries méthylantes (Parks et al., 2013).

Possibles effets du changement climatique sur la méthylation

La méthylation du Hg est étroitement liée à l'activité bactérienne qui peut être éventuellement favorisée lorsque l'on augmente la température. La disponibilité et la bioaccumulation du Hg dans la chaîne alimentaire peut être influencée par le climat (Liu et al., 2011). Résultant d'une activité bactérienne favorisée, un pic du taux de méthylation du Hg a été observé en été lorsque la température du milieu est la plus haute (Bisogni Jr and Lawrence, 1975; Bodaly et al., 1993; Wright and Hamilton, 1982). Généralement, les sédiments produisent plus de MMHg durant les mois d'été comparés aux

mois d'hiver (Canário et al., 2007). Cependant la déméthylation dans les sédiments est aussi majoritairement un processus bactérien et plus de déméthylation est aussi attendue à hautes températures. L'augmentation attendue de la concentration totale en Hg (HgT), de la matière organique dissoute et des nutriments provenant des cours d'eau, devrait modifier les taux de méthylations et la biodisponibilité du Hg sans pour autant savoir dans quelles proportions (AMAP, 2011).

Ainsi sous l'influence du climat une biodisponibilité différente du MMHg à la base de la chaîne alimentaire est attendue provoquant par bioamplification des concentrations plus élevées chez les prédateurs terminaux (voir partie 1.3.3). Cependant, un possible changement dans le niveau de productivité primaire ou d'eutrophisation peut nuancer ce phénomène. Une grande quantité de biomasse algale peut engendrer une dilution du MMHg à la base de la chaîne alimentaire et donc une moindre bioaccumulation du MMHg (Pickhardt et al., 2002; Pickhardt et al., 2005). Ce mécanisme de « bio-dilution » a été évoqué pour expliquer les différences de concentrations observées entre les écosystèmes oligotrophiques et eutrophiques.

1.3.2.3. Etudes environnementales : Méthylation en Arctique

Alors que la méthylation dans la cryosphère (Douglas et al., 2012) ou la décomposition du DMHg (Nord Atlantique, (Mason et al., 1995b)) peuvent être localement une source importante de MMHg, la majorité des études suggère la prédominance de la méthylation aqueuse du Hg inorganique à l'échelle globale (Heimbürger et al., 2010; Mason et al., 2012). Des souches de bactéries prélevées dans les eaux de surfaces de l'Antarctique (Pongratz and Heumann, 1999) et des macroalgues provenant de fiords d'Arctique (Pongratz and Heumann, 1998a) ont montré des capacités à produire du MMHg et du DMHg suggérant que la méthylation du Hg inorganique pouvait avoir son origine dans la colonne d'eau des environnements polaires. De plus la corrélation entre MMHg et DMHg et les concentrations de « *Chlorophylle a* » supporte l'idée que ces espèces ont une origine biogénique dans la zone euphotique (Pongratz and Heumann, 1998b; Pongratz and Heumann, 1999). La distribution verticale de Hg méthylé dans les eaux de l'Archipel Canadien Arctique indique que ces espèces sont aussi produites dans les profondeurs « sub-thermocline » ou le MMHg et DMHg représentent une grande fraction du HgT (Kirk et al., 2008).

De récents profils océaniques haute résolution dans d'autres régions ont montré une relation entre les concentrations de MMHg et l'« apparent oxygen utilization (AOU) » ou « organic carbon remineralization rate (OCRR) », reliant la méthylation à la zone de minimum d'oxygène (OMZ) présente à différentes profondeurs selon l'océan/région (Cossa et al., 2009; Sunderland et al., 2009). Alors que dans les environnements d'océans ouverts, la méthylation du Hg inorganique dans la colonne d'eau est probablement la principale source de MMHg (Cossa et al., 2009; Heimbürger et al.,

La principale information apportée par l'étude de Lehnerr et al. (2011) est que 76% du MMHg de la zone euphotique provient de la méthylation dans la colonne d'eau. Inversement dans les eaux intermédiaires ou profondes la majorité du MMHg (84%) provient d'autres sources dont les sédiments probablement. La compréhension de ce mécanisme en Arctique est une des clefs pour pouvoir expliquer les niveaux de concentrations élevées en MMHg dans la chaîne alimentaire malgré les faibles concentrations en MMHg dans la colonne d'eau (Kirk et al., 2012).

1.3.2.4. Déméthylation

Tout comme la méthylation du Hg inorganique, la déméthylation du MMHg peut être biotique (Compeau and Bartha, 1984; Oremland et al., 1991), abiotique (photochimique (Hammerschmidt and Fitzgerald, 2006; Seller et al., 1996a) ou non photochimique (Khan and Wang, 2010)). Les processus biotiques de déméthylation par les SRB ou bactéries méthanogènes sont suggérés dominants dans les sédiments et le périphyton (Oremland et al., 1991). Bien que la déméthylation microbienne ait été observée dans toute la colonne d'eau (Monperrus et al., 2007), la photo-déméthylation est considérée comme le principal processus dans la zone euphotique en particulier en milieu océanique (Seller et al., 1996a). Enfin la déméthylation abiotique non photo-induite a été observée en laboratoire mais non documentée dans l'environnement (Khan and Wang, 2010).

Depuis la démonstration de l'importance de la photo-déméthylation dans les systèmes aquatiques (Seller et al., 1996a) de nombreuses études ont suivi pour tenter de comprendre le mécanisme à l'origine de ce processus (Hammerschmidt and Fitzgerald, 2010; Zhang and Hsu-Kim, 2010). Il a été montré récemment en laboratoire que la photo-déméthylation était plus importante dans l'eau douce que dans l'eau salée due à la spéciation du MMHg majoritaire CH_3HgCl qui apparaît plus résistante à la photo-déméthylation (Zhang and Hsu-Kim, 2010). C'est en accord avec les mesures de taux de déméthylation en Arctique de Lehnerr et al. (2012) : dans les étangs d'eau douce ($3,4 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2\text{E}^{-1}$, (Lehnerr et al., 2012)) les taux de déméthylation sont environ 3-4 fois supérieurs à ceux observés dans l'eau de mer ($10^{-3} \text{ m}^2\text{E}^{-1}$, (Lehnerr et al., 2011)). Cependant la plus grande profondeur de la zone euphotique dans les eaux marines fait de la déméthylation un mécanisme important malgré ces différences de rendements de déméthylation.

1.3.2.5. Etudes environnementales : Déméthylation du MMHg en Arctique

Avec la constante de réaction la plus élevée dans les zones euphotiques et intermédiaires Arctique (respectivement $0,3 \text{ jour}^{-1}$ et $0,4 \text{ jour}^{-1}$ déterminées par (Lehnerr et al., 2011)), le bilan net entre la méthylation et la déméthylation du MMHg est supposé refléter la quantité de MMHg bio-disponible pour la chaîne trophique. La photodéméthylation varie de façon saisonnière en Arctique due à l'absence de lumière en hiver et sa présence continue en été, et surtout à la présence de glace qui limite la pénétration de lumière et les transferts océan-atmosphère.

Effet de la disparition de la couverture de glace sur la photodéméthylation du MMHg

Une des voies les plus importantes de dégradation du MMHg à la surface des lacs/océans est le photo-déméthylation (Hammerschmidt and Fitzgerald, 2006; Seller et al., 1996b). Depuis que les taux de photo-réduction ont été corrélés à l'intensité lumineuse et au temps d'exposition, la décroissance graduelle de la banquise devrait favoriser ce mécanisme via deux effets :

- Une plus longue exposition du compartiment aquatique aux rayons solaires
- Un meilleur transfert du Hg^0 formé du compartiment aquatique vers le compartiment atmosphérique

L'étude sur les œufs d'oiseaux de notre groupe a montrée récemment, grâce à l'observation d'un fort gradient latitudinal des signatures isotopiques du Hg, que la couverture de glace semble jouer un rôle important dans le processus de photodéméthylation en Alaska (Figure 7, (Blum, 2011; Point et al., 2011)). Il est estimé dans cette étude préliminaire que la disparition de la couverture de glace en Arctique pourrait mener à une augmentation de l'évasion de MMHg via photo-déméthylation de $8\pm 4\%$. Dans cette même lignée les chapitres 4 et 5 confirment ces observations avec l'étude d'autres espèces bio-indicatrices.

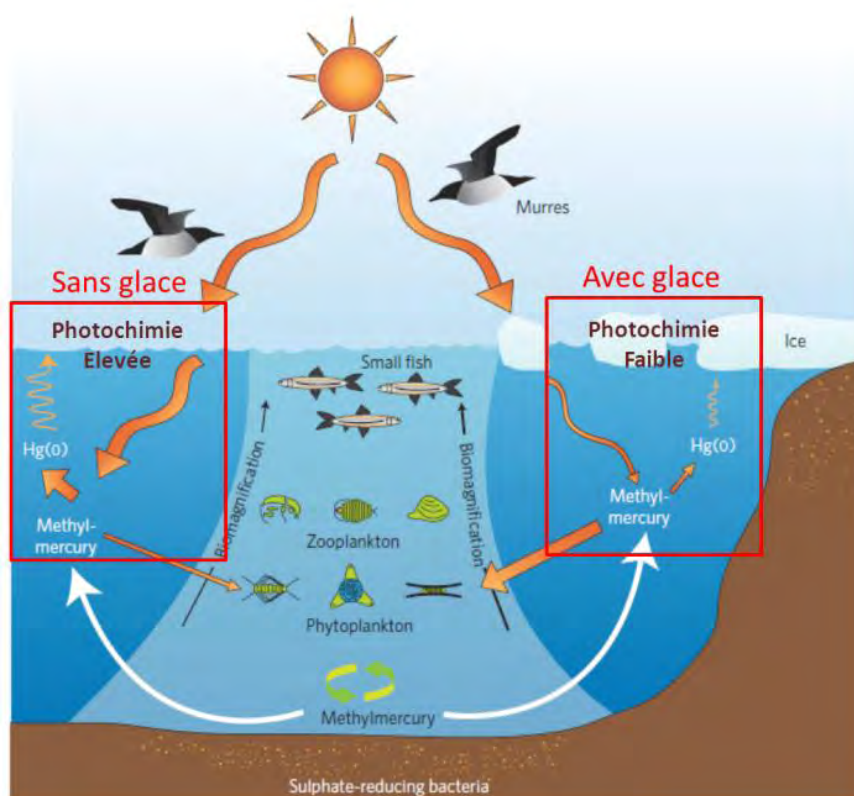


Figure 7 : Représentation schématique de l'importance de la couverture de glace sur l'activité photochimique du Hg. Modifié de (Blum, 2011).

1.3.3. Passage du Hg abiotique en Hg biotique

1.3.3.1. Assimilation et bio-amplification du Hg dans les 1^{ers} niveaux trophiques

Les organismes unicellulaires (bactéries, micro-algues, protozoaires) sont supposés être la principale voie d'entrée du MMHg dans la chaîne trophique (Douglas et al., 2012). Cette entrée se fait probablement par les organismes hétérotrophes lorsqu'ils ingèrent soit les micro-organismes responsables de la formation du MMHg, soit les algues (ou phytoplancton) ayant concentré du MMHg dissous dans la colonne d'eau. Une étude portant sur les diatomées a montré que l'ingestion de MMHg et Hg inorganique se faisait par diffusion passive sous une forme non-chargée, complexée et liposoluble (Mason et al., 1996). Alors que l'ingestion des deux composés liposolubles se fait de façon égale, la prédominance du MMHg chez les poissons est le fait d'une meilleure efficacité lors du transfert trophique du MMHg par rapport au Hg inorganique. Par exemple, le MMHg dans le plancton, qui s'accumule dans le cytoplasme de la cellule est assimilé par le zooplancton avec une efficacité quatre fois supérieure au Hg inorganique qui s'accumule plutôt au niveau de la membrane cellulaire. Cette sélectivité permet d'expliquer comment on retrouve entre 20 et 50% de MMHg dans le phytoplancton, puis MMHg > 75% à partir du deuxième niveau trophique (zooplancton), pour atteindre des valeurs proches de 90-100% dans le muscle des prédateurs terminaux (Figure 8). En Arctique, les populations bactériennes ont développé des assemblages particuliers de lipides dans leurs membranes pour s'adapter aux températures froides (Méthé et al., 2005). Il est possible que cette adaptation modifie les taux d'«uptake» des différentes espèces de Hg comparés aux autres environnements (Douglas et al., 2012).

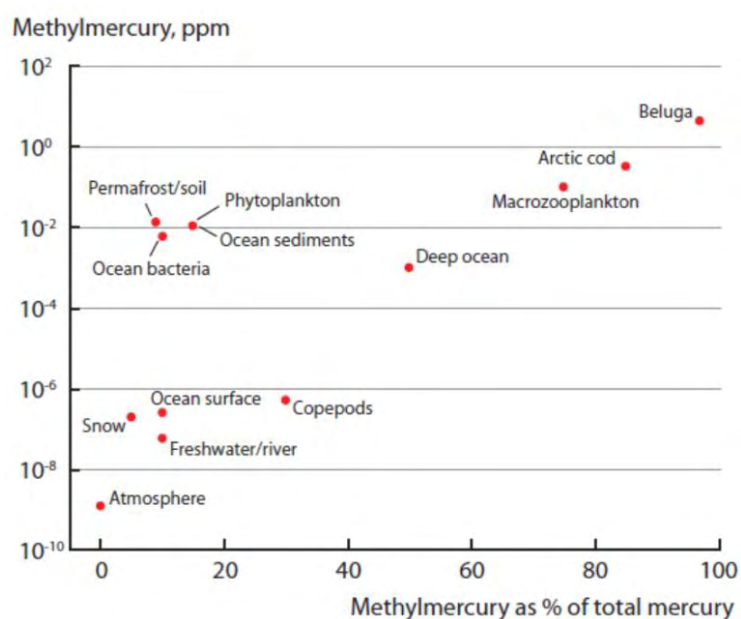


Figure 8 : Biomagnification du méthylmercure dans la chaîne trophique Arctique (Douglas et al., 2012)

En plus de cette discrimination des espèces du Hg le long de la chaîne trophique, on observe aussi une augmentation des concentrations en HgT (donc MMHg) à chaque niveau trophique. Ce phénomène aussi appelé bio-amplification existe si la concentration dans un prédateur est supérieure à la concentration moyenne de ses proies. Il est le plus important au premier niveau trophique où le facteur d'enrichissement entre l'eau et le phytoplancton est le plus fort (10^4 à $10^{5.5}$ entre l'eau et le phytoplancton et $10^{6.5}$ entre l'eau et le poisson, (Mason et al., 1995a)). Une explication possible pourrait être liée au fait que le transfert du MMHg chez les niveaux trophiques élevés se fait quasi-uniquement par transfert trophique alors qu'un processus de bioconcentration est plutôt à l'œuvre au niveau du phytoplancton. Contrairement au MMHg, le Hg inorganique est peu bio-amplifié (Watras et al., 1998). Dans la chaîne trophique Arctique on retrouve les mêmes processus de bio-amplification avec des concentrations en HgT qui augmentent avec les niveaux trophiques estimés par des mesures de $\delta^{15}\text{N}$ (Figure 9). Cette relation est loin d'être parfaite due notamment aux différentes capacités métaboliques observées chez les prédateurs terminaux leur permettant de limiter leur exposition au MMHg (voir partie 1.3.3.2.) ou du fait de différentes valeurs de ligne de base en $\delta^{15}\text{N}$ entre écosystèmes.

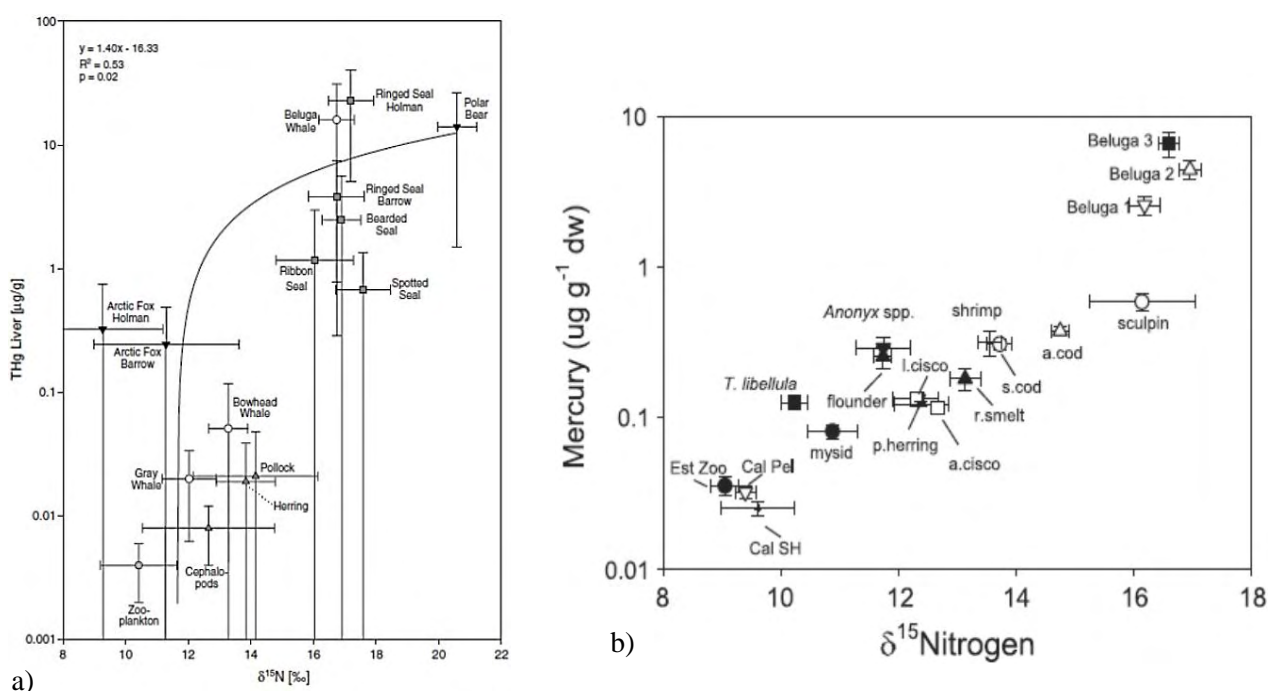


Figure 9 : a) Traceurs de niveau trophique ($\delta^{15}\text{N}$) vs THg dans le foie (ou le corps entier pour les invertébrés ou poissons) pour une chaîne trophique Arctique (en grande partie Alaska). La régression linéaire donne les facteurs de bioamplification. D'après (Dehn et al., 2006). b) $\delta^{15}\text{N}$ vs THg dans le muscle (ou le corps entier pour les invertébrés ou poissons) pour une chaîne trophique Arctique (Mer de Beaufort). D'après (Kirk et al., 2012).

En conclusion, les processus d'entrée et de transfert du MMHg dans la chaîne trophique sont encore peu connus et pas suffisamment décrits, mais il est évident que la concentration en MMHg dans les niveaux trophiques est fortement influencée par la capacité de méthylation de l'environnement à la base de l'écosystème. Une grande partie des variations spatiales observées dans les concentrations en mercure chez certaines espèces de poissons peuvent être attribuées à des variations affectant la production bactérienne locale de MMHg (Harris et al., 2010).

1.3.3.2. Bioaccumulation et métabolisme du Hg chez les prédateurs terminaux

Bioaccumulation

De par un faible taux d'excrétion du MMHg comparé à son assimilation, on observe en général une augmentation de la concentration en MMHg dans les tissus biologiques au cours de la vie d'un individu (estimée par l'âge ou la taille). Par exemple, les concentrations en Hg de 566 baleines beluga de l'Arctique de l'est et de l'ouest ont été compilées par Lockhart et al. (2005) et confrontées à l'âge des individus (Figure 10, (Lockhart et al., 2005)).

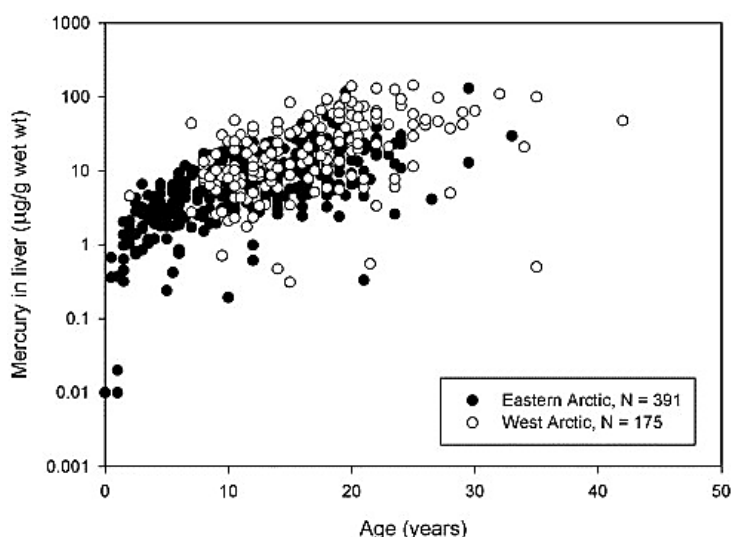


Figure 10 : Concentration en Hg dans les foies de 566 baleines beluga de différents âges.

D'après (Lockhart et al., 2005).

Si l'on prend en compte chaque collection séparément (n=32), toutes sauf deux ont des pentes positives et les deux tiers ont un $r^2 > 0,50$. Dans ce cas, une correction de l'âge est possible pour comparer les différents individus (Lockhart et al., 2005). Cette tendance peut être cependant légèrement biaisée par le fait qu'un individu âgé plus expérimenté peut adapter sa stratégie de fourragement vers des proies de niveaux trophiques plus élevés.

Métabolisme/Hg dans le foie

Lors de cette thèse de doctorat, les foies de 53 phoques annelés, 54 baleines belugas et 15 ours polaires ont été étudiés. Comment interpréter le niveau de concentration de Hg mesuré dans le foie ?

Alors que l'exposition au Hg par les mammifères marins se fait principalement par transfert trophique sous sa forme méthylé MMHg (Bloom, 1992), le foie présente la particularité (avec les reins et le cerveau) d'accumuler le Hg majoritairement sous sa forme inorganique (Itano et al., 1984; Nigro, 1994; Wagemann et al., 2000). En 1973, Koeman et al. ont montré la première forte corrélation entre le HgT et le sélénium dans les foies de mammifères marins de la mer du Nord avec un ratio d'environ 1:1 (Koeman et al., 1973). Un phénomène similaire a été observé chez deux mammifères marins de la mer Méditerranée (Arago, 1980) : chez des dauphins capturés dans l'Océan Pacifique (Itano et al., 1984) et chez des phoques de l'Arctique (Wagemann et al., 1996). Basée sur des extractions successives physico-chimiques, une étude de Wagemann et al. (2000) a permis d'identifier et de quantifier différentes formes de Hg dans le foie de phoques annelés de l'Arctique Canadien (Figure 11, (Wagemann et al., 2000)). On y retrouve majoritairement du Hg inorganique (95%) lié au sélénium (HgSe, 53%) ou non (Hg inorganique, 42%). En moyenne seulement 6% du Hg est sous forme organique avec seulement 2% de MMHg.

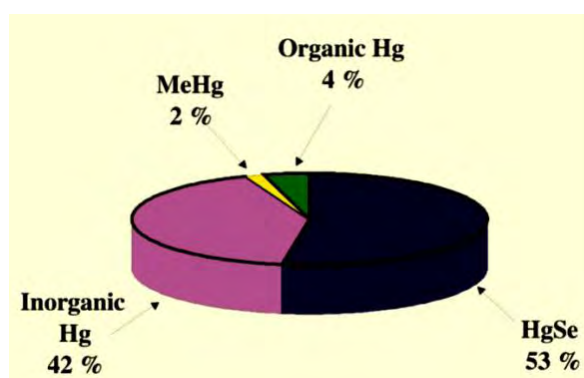


Figure 11 : Estimation des pourcentages des différents composés du Hg observés dans le foie de 45 phoques annelés de l'Arctique Canadien. D'après (Wagemann et al., 2000)

Présentant les plus hautes concentrations en HgT et une forte corrélation avec Se (figure 12a), le foie a rapidement été considéré comme un organe clé vis-à-vis de l'activité métabolique liée au Hg. Une réaction de déméthylation du MMHg in-vivo est fortement suspectée pour expliquer les différences de proportion de MMHg entre la proie (MMHg \approx 90-100%) et le foie du prédateur (MMHg \approx 0-20%) (Bloom, 1992; Wagemann et al., 2000). L'analyse systématique de la spéciation du Hg a montré une faible proportion de MMHg ainsi que sa décroissance rapide en fonction de la concentration en HgT (Figure 12b) suggérant aussi une possible fonction de déméthylation du Hg dans le foie (Becker et al., 2000). L'implication du foie dans ce mécanisme est suggérée du fait de son rôle connu d'organe de détoxification pour d'autres contaminants (Ikemoto et al., 2004).

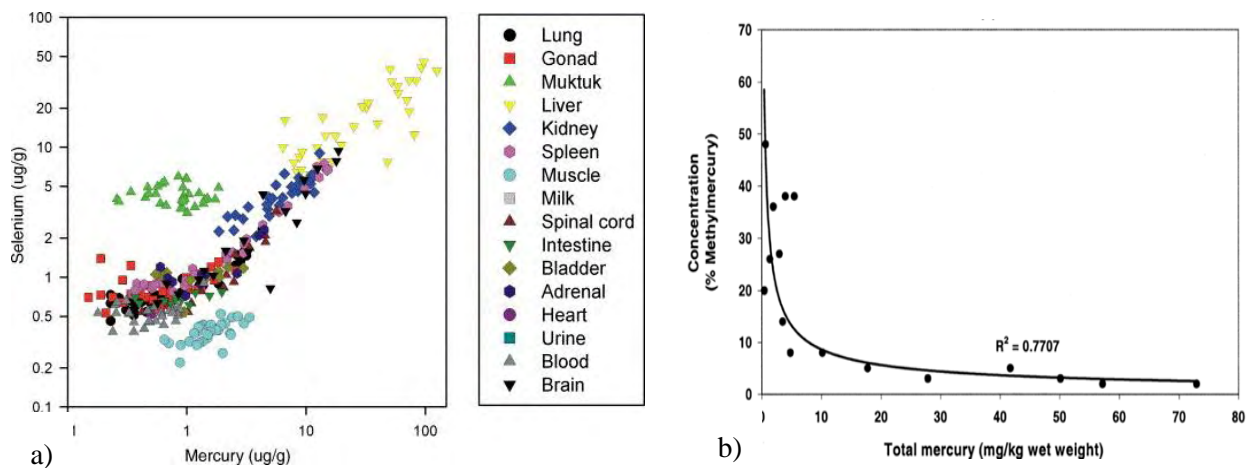
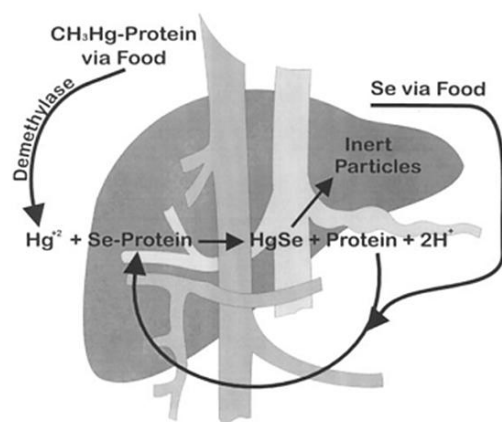


Figure 12 : a) Relation Hg vs Se observée dans les différents organes du beluga, d'après a) (Lockhart et al., 2005). b) Décroissance du %MMHg avec la concentration en HgT chez le beluga, d'après (Becker et al., 2000)

Un mécanisme simplifié a été proposé par Wagemann et al. (1998) impliquant une enzyme (déméthylase) permettant de déméthyliser le MMHg arrivant par la voie sanguine dans le foie (Figure 13, (Wagemann et al., 1998)). Le Hg inorganique ainsi formé se complexerait avec Se pour former des nanoparticules insolubles et inertes (HgSe). Une équipe de chercheurs japonais a montré des preuves que le MMHg peut être converti en Hg inorganique par des cellules phagocytaires prélevées dans le sang de rats (Suda et al., 1992). Suda et al. (1992) ont aussi montré que les microsomes du foie sont aussi capables de déméthyliser le MMHg, via l'action de la NADPH-cytochrome P-450 reductase responsable de la production de radicaux hydroxyles (Suda and Hirayama, 1992). D'après ces études expérimentales et la spéciation particulière du Hg observée, le foie réaffirme sa fonction d'organe de régulation et de dégradation du MMHg ingéré.

Figure 13 : Mécanisme hypothétique de déméthylation du MMHg et la formation de complexe HgSe inertes dans le foie. D'après (Wagemann et al., 1998).



Chapitre 2.

Les isotopes stables du mercure

Chapitre 2. Les isotopes stables du Hg

Le mot « isotope » vient du Grec et signifie « même place ». Deux isotopes sont deux atomes contenant le même nombre de protons (Z) mais un nombre différent de neutrons (N). Ainsi on les retrouve à la même place dans le tableau périodique des éléments. La découverte des isotopes des éléments a eu lieu au début des années 1900 et résulte d'études chimiques accompagnant les études portant sur les substances radioactives. Boltwood observa en 1906 que l'ionium (ancien nom du Thorium-230) et le thorium (en réalité Thorium-232) avaient des propriétés chimiques tellement identiques qu'il était impossible de les séparer une fois mélangés (Boltwood, 1906). Ainsi d'autres études ont suivi menant à la découverte des différents isotopes stables et radioactifs des éléments connus (résumé dans (Urey, 1947)). Un isotope est considéré comme stable si son temps de désintégration est supérieur à 1 milliard d'années.

La première séparation des isotopes du Hg a été réalisée par les Nobelistes Brønsted et von Hevesy (1920) par évaporation et re-condensation du Hg liquide sur une surface froide. Ils ont attribué la faible différence de densité mesurée (par pycnométrie) entre le Hg condensé ($d=0.999980$) et le mercure résiduel ($d=1.000031$) à un fractionnement isotopique. De nombreuses études ont suivi, notamment par Alfred Nier en 1937 puis 1950 qui utilisa pour la première fois les techniques de spectrométrie de masse pour établir les abondances naturelles des isotopes du Hg (Nier, 1937; Nier, 1950). L'intérêt des isotopes stables non-traditionnels a considérablement augmenté à la fin du 20^{ème} siècle avec l'émergence des spectromètres de masse à multi collection (MC-ICPMS) capables de mesurer les variations d'abondances isotopiques de nombreux éléments, e.g. Fe, Cu, Zn, Ca, Mg, et le Hg.

2.1. Théorie du fractionnement isotopique

Les premiers travaux sur le fractionnement isotopique des éléments dans la nature se sont portés sur des systèmes isotopiques d'éléments légers (C, H, N, O, S). Notamment parce que leurs différences de masses relatives ($\Delta m/m$) sont élevées par rapport aux éléments plus lourds : le fractionnement attendu entre leurs isotopes est plus élevé et donc plus facile à mesurer (Johnson et al., 2004). Ainsi, le fractionnement isotopique est le plus grand pour l'hydrogène et diminue ensuite avec Z (Figure 14, (Johnson et al., 2004)).

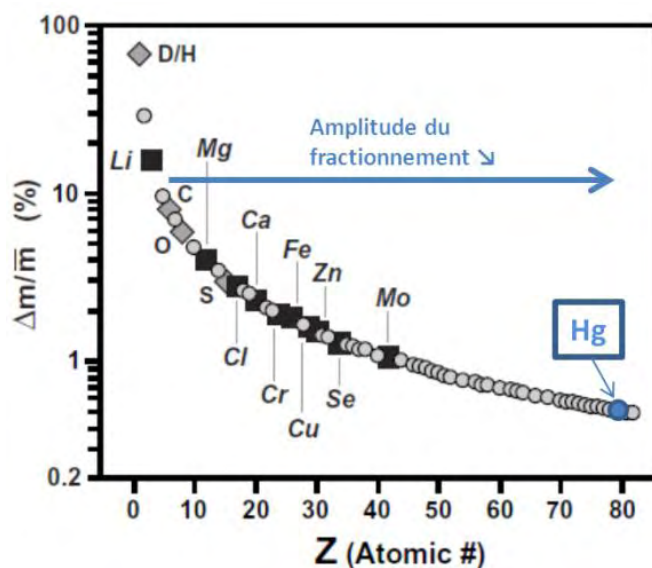


Figure 14 : Différence de masse relative ($\Delta m/m$) pour les éléments ayant plus de 2 isotopes en fonction du numéro atomique (Z). Δm est la différence de masse entre deux isotopes, soit $\Delta m=1$ et m est la masse moyenne des isotopes de l'élément considéré. Modifié de (Johnson et al., 2004).

Pour le Hg, $\Delta m/m$ est l'un des plus faibles atteignant 1 à 3%. On observe cependant que l'amplitude du fractionnement isotopique du Hg naturelle ne suit pas cette tendance en montrant des valeurs très supérieures à la plupart des éléments ($\approx 8\%$ en $\delta^{202}\text{Hg}$, (Yin et al., 2010)). Ce constat, attribué à la présence des différents niveaux d'oxydations (Smith et al., 2005), fait du Hg un élément très intéressant isotopiquement pour tenter de tracer différentes sources ou processus. Le mercure naturel a sept isotopes stables allant des masses ^{196}Hg au ^{204}Hg avec les abondances naturelles approximatives (variables en réalité) : ^{196}Hg (0.15%), ^{198}Hg (9.97%), ^{199}Hg (16.9%), ^{200}Hg (23.1%), ^{201}Hg (13.2%), ^{202}Hg (29.9%), ^{204}Hg (6.87%).

Les résultats de la bibliographie sont, ici, exprimés en notation $\delta^{xxx}\text{Hg}$ qui est le rapport de l'isotope xxx sur l'isotope de référence 198 par rapport à ce même rapport d'un matériel de référence, le NIST 3133 :

$$\delta^{xxx}\text{Hg} = \left[\left(\frac{\left(\frac{^{xxx}\text{Hg}}{^{198}\text{Hg}} \right)_{\text{sample}}}{\left(\frac{^{xxx}\text{Hg}}{^{198}\text{Hg}} \right)_{\text{NIST 3133}}} \right) - 1 \right] \times 1000 \quad (\text{‰})$$

$\delta=0\text{‰}$ signifie que l'échantillon a la même signature isotopique que le standard

$\delta>0\text{‰}$ signifie que l'échantillon est enrichi en isotopes lourds (ou appauvri en légers)

$\delta<0\text{‰}$ signifie que l'échantillon est enrichi en isotopes légers (ou appauvri en lourds)

2.1.1. Détermination de fractionnements isotopiques

2.1.1.1. Théorique

Le fractionnement isotopique est un enrichissement d'un isotope par rapport à une autre dans un échantillon dû à différents processus physiques ou chimiques. Ainsi, le fractionnement isotopique d'un élément est la répartition de ses isotopes entre 2 substances ou entre 2 phases de la même substance et peut être défini par le facteur de fractionnement alpha (α) qui est donné par le rapport de 2 isotopes dans un composé A (R_A) divisé par le rapport de ces mêmes 2 isotopes dans un composé B (R_B) :

$$\alpha = \frac{R_A}{R_B}$$

et dans le cas du Hg :

$$\alpha^x = \frac{\left(\frac{^x\text{Hg}}{^{198}\text{Hg}} \right)_A}{\left(\frac{^x\text{Hg}}{^{198}\text{Hg}} \right)_B}$$

Avec des valeurs très proches de l'unité (2 à 4 décimales près) il est souvent plus pratique d'utiliser la notation ε :

$$\varepsilon = 1000 \times (\alpha - 1) \approx 1000 \times \ln(\alpha)$$

car ε approche le fractionnement en partie par millier (‰), ce qui est similaire à la notation δ .

2.1.1.2. Expérimental

Lors d'études expérimentales en laboratoire d'une réaction donnée il est possible à partir des diagrammes tri-isotopiques (exemple Figure 15) de déterminer la différence de signatures isotopiques entre les produits et réactifs.

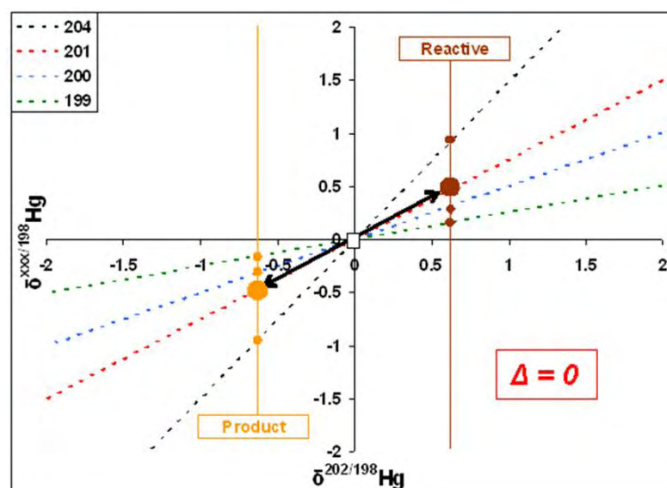


Figure 15 : Diagramme tri-isotopique représentant les variations des signatures isotopiques entre les réactifs et les produits d'une réaction. Les lignes en pointillées représentent les droites de fractionnement dépendant de la masse théorique pour chaque isotopes. La composition du réactif initial ($\delta^{xxx}\text{Hg}$) est égale à 0. D'après (Perrot, 2012).

On utilise ensuite les lois de distillation de Rayleigh (Hoefs, 1997). Dans un système ouvert l'amplitude du fractionnement isotopique générée par une réaction chimique donnée peut être déduite de :

$$\ln \frac{0.001 \times \delta^{xxx/198}\text{Hg}(\text{réactif})_t + 1}{0.001 \times \delta^{xxx/198}\text{Hg}(\text{réactif})_{t_0} + 1} = \left(\frac{1}{\alpha} - 1\right) \times \ln f$$

avec $\delta^{xxx/198}\text{Hg}(\text{réactif})_t$ la composition isotopique du réactif résiduel au temps t de la réaction, $\delta^{xxx/198}\text{Hg}(\text{réactif})_{t_0}$ la composition isotopique initiale du réactif, f la fraction du réactif résiduel au temps t , et α le facteur de fractionnement réactif-produit cinétique. On peut généralement déterminer graphiquement la valeur de $((1/\alpha)-1)$ par des méthodes d'estimations optimisées (Scott et al., 2004). A l'équilibre ou dans le cas d'un système fermé, on calcule tout simplement la différence entre le $\delta^{xxx/198}\text{Hg}$ du réactif et du produit :

$$\varepsilon = \delta^{xxx/198}\text{Hg}(\text{réactif}) - \delta^{xxx/198}\text{Hg}(\text{produit}) = 1000 \times \ln \alpha$$

Ces deux calculs permettent de calculer un facteur de fractionnement à l'équilibre ou cinétique pour chaque isotope (199, 200, 201, 202, 204) entre les réactifs et les produits d'une réaction menée en

laboratoire. Pour le mercure on distingue deux grands types de fractionnements : Le fractionnement dépendant de la masse (MDF) et le fractionnement indépendant de la masse (MIF).

2.1.2. Mécanismes théoriques à l'origine de MDF

Généralement le devenir chimique d'un élément est déterminé par sa structure électronique, qui est la même chez tous ses isotopes. Cependant, le remplacement d'un atome par un de ses isotopes produit une faible différence dans les propriétés physico-chimique de l'atome (notamment par différence de masse). Globalement, un isotope dit léger va réagir plus facilement qu'un isotope lourd grâce à des liaisons légèrement moins stables (Hoefs, 1997). Les lois de fractionnement dépendant de la masse ont été très rapidement décrites et définies après l'analyse des premiers fractionnements isotopiques (Bigeleisen, 1949; Urey, 1947). Deux types de réactions sont à l'origine de fractionnement dépendant de la masse : les réactions d'équilibre et les réactions cinétiques (Figure 16).

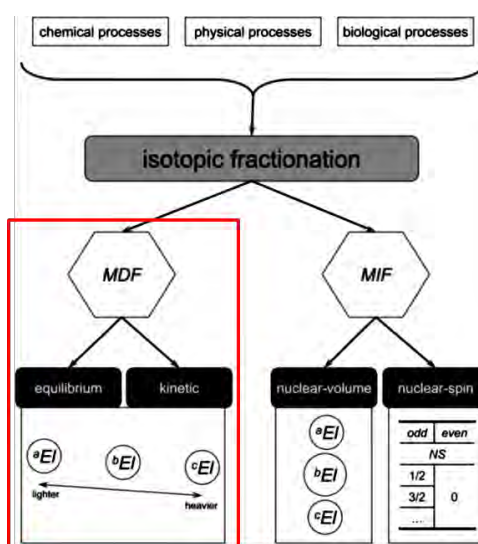
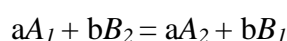


Figure 16 : Principaux mécanismes à l'origine de MDF (encadré en rouge), modifié de (Epov et al., 2011)

2.1.2.1. L'effet d'équilibre ou échange isotopique

L'effet d'équilibre inclue des processus avec des mécanismes très différents. Le terme d'échange isotopique est aussi utilisé afin d'inclure la situation où il n'y a pas de réaction nette mais un changement de distribution isotopique entre différentes substances, phases ou molécules dans un système fermé (Figure 17, (Hoefs, 1997)). Dans tous les cas l'équilibre peut être écrit :



La fonction de partage est définie par :

$$Q = \sum_i \left(g_i \times \exp\left(\frac{-E_i}{k \times T}\right) \right)$$

où la somme considère tous les niveaux d'énergies autorisés (E_i), le poids statistique du i^{th} niveau (g_i), la constante de Boltzmann (k) et la température (T). La fonction de partage Q peut être divisée en trois facteurs correspondant chacun à un type d'énergie : translation, rotation, vibration :

$$Q_2/Q_1 = (Q_2/Q_1)_{\text{trans}} \times (Q_2/Q_1)_{\text{rot}} \times (Q_2/Q_1)_{\text{vib}}$$

L'énergie de translation et de rotation est plus ou moins la même quel que soit l'isotope (excepté l'hydrogène). Cela fait de la différence dans les énergies de vibrations la principale source de fractionnement isotopique (Eпов et al., 2011; Vanhaecke et al., 2009). Ainsi les isotopes les plus lourds qui ont besoin d'une énergie vibrationnelle plus forte que les légers pour être dissociés d'une liaison chimique sont plus stables dans une molécule avec les plus fortes liaisons chimiques. A l'inverse, les isotopes légers seront alors retrouvés libres ou dans les liaisons plus faibles de la molécule (Urey, 1947). Autre observation, ce fractionnement est dépendant de la température et un fractionnement nul est attendu à très haute température (Hoefs, 1997). Cette tendance ne semble cependant pas vraie pour les métaux lourds (Bigeleisen, 1996b) où le fractionnement isotopique n'est pas induit uniquement par des différences de masses mais aussi par des différences de volumes nucléaires (section 2.2.3) (Bigeleisen, 1996b; Schauble, 2007).

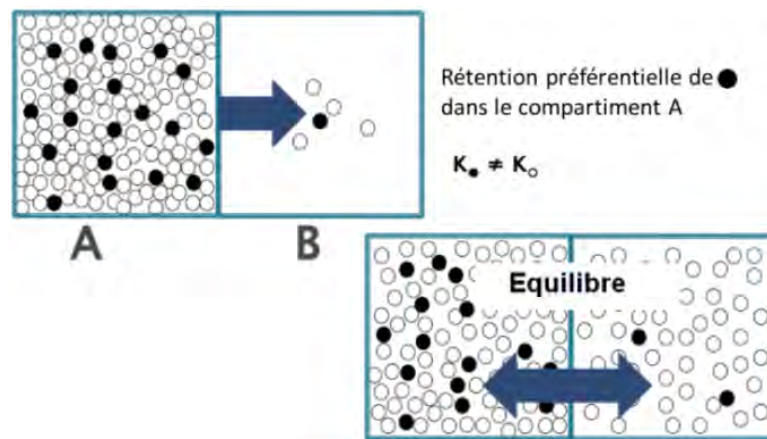


Figure 17 : Représentation schématique du fractionnement à l'équilibre. Modifié de (Kuder, 2012)

2.1.2.2. L'effet cinétique

Le deuxième mécanisme à l'origine du MDF est l'effet cinétique (« kinetic isotope effect »). Il est associé à des réactions incomplètes et unidirectionnelles en système ouvert comme l'évaporation,

les réactions de dissociations, de diffusions ou les réactions biologiques (Figure 18). L'énergie de dissociation d'une liaison peut être différente selon la masse de l'isotope. Comme pour l'effet à l'équilibre, les molécules contenant des isotopes lourds réagissent plus lentement que ceux avec des isotopes légers. Par conséquent, les réactifs deviennent enrichis en isotopes lourds tandis que les produits de réaction deviennent enrichis en isotopes légers.

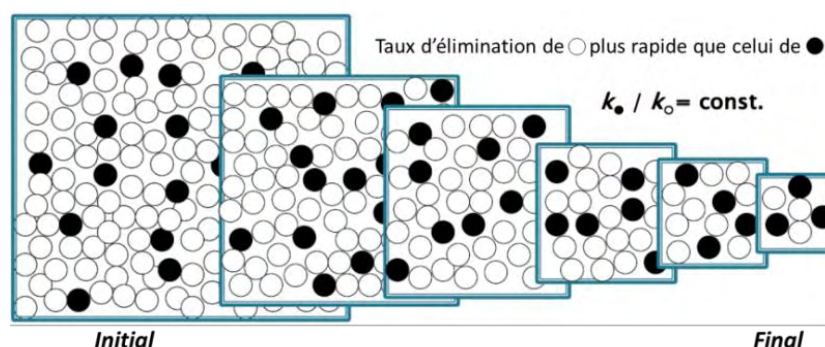


Figure 18 : Représentation schématique du fractionnement cinétique. Modifié de (Kuder, 2012).

2.1.3. Mécanismes théoriques à l'origine du MIF

2.1.3.1. Introduction

Autour de l'année 2007 différents groupes de recherche indépendants ont observé le même phénomène de fractionnement indépendant de la masse sur le Hg (Bergquist and Blum, 2007; Jackson et al., 2008; Laffont et al., 2009). Même si c'est un phénomène rare dans les milieux naturels terrestres, le Hg n'est pas le seul élément, et du MIF > 1‰ a été déjà observé avec les isotopes de l'oxygène (Thiemens and Heidenreich, 1983) et du soufre (Pavlov and Kasting, 2002). De nombreux éléments comme Ti, Cr, Zn, Sr, Mo, Ru, Cd, Sn, Te, Ba, Nd, Sm, Gd, Yb et U présentent aussi du MIF mais à un niveau très faible (< 0.5‰) lors des manipulations expérimentales très particulières (complexation par des 'crown ethers') et sans lien avec le type de processus rencontrés dans l'environnement. Le fractionnement isotopique indépendant de la masse est paramétré avec la notation « grand delta » (Δ) qui est la différence entre le ratio isotopique mesuré et le ratio isotopique prédit par les lois de fractionnement dépendent de la masse :

$$\Delta^{xxx}\text{Hg} = \delta^{xxx}\text{Hg} - \beta_{xxx} \times \delta^{202}\text{Hg}$$

où β_{xxx} est le facteur cinétique ou d'équilibre défini par (Young et al., 2002) :

$$\beta_{xxx}^{\text{cinétique}} = \frac{\ln(198/xxx)}{\ln(198/202)} \quad \beta_{xxx}^{\text{équilibre}} = \frac{(1/198) - (1/xxx)}{(1/198) - (1/202)}$$

La différence entre les deux mécanismes (équilibre et cinétique) est infime et n'a pas d'incidence au vu des fractionnements observés et des erreurs analytiques. Bergquist et Blum recommandent dans leur publication de 2009 les valeurs de consensus (Bergquist and Blum, 2009):

$$\Delta^{204}\text{Hg} \approx \delta^{204}\text{Hg} - (\delta^{202}\text{Hg} \times 1.493)$$

$$\Delta^{201}\text{Hg} \approx \delta^{201}\text{Hg} - (\delta^{202}\text{Hg} \times 0.752)$$

$$\Delta^{200}\text{Hg} \approx \delta^{200}\text{Hg} - (\delta^{202}\text{Hg} \times 0.502)$$

$$\Delta^{199}\text{Hg} \approx \delta^{199}\text{Hg} - (\delta^{202}\text{Hg} \times 0.252)$$

Pour le Hg, deux mécanismes sont principalement à l'origine du MIF (Figure 19) : « Magnetic Isotope Effect » (MIE) et le Nuclear Volume Effect » (NVE). Un autre mécanisme plus marginal a possiblement été récemment observé, le « Self-Shielding Effect » (SEE).

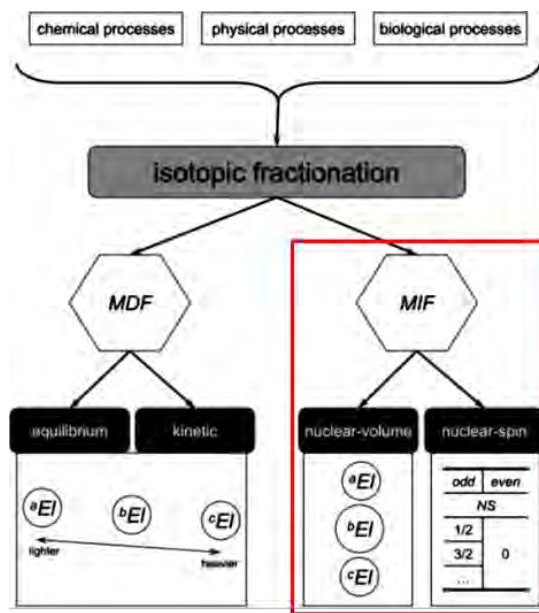


Figure 19 : Principaux mécanismes à l'origine de MIF (encadré en rouge), modifié de (Epo et al., 2011)

2.1.3.2. NVE

Théorie du NVE

Le NVE a été suggéré par Bigeleisen en 1996 (Bigeleisen, 1996a) pour expliquer le MIF observé chez l'uranium (Fujii et al., 1989) ce qui est pertinent pour les éléments lourds en général. Par la suite, Schauble en 2007 a donné une interprétation théorique quant à son application pour les isotopes du Hg et du Tl (Schauble, 2007). En augmentant le nombre de neutrons, le volume et le rayon

nucléaire des isotopes n'augmentent pas linéairement avec la masse (Figure 20). Ces effets, bien que faibles pour les isotopes légers, deviennent significatifs pour les isotopes lourds.

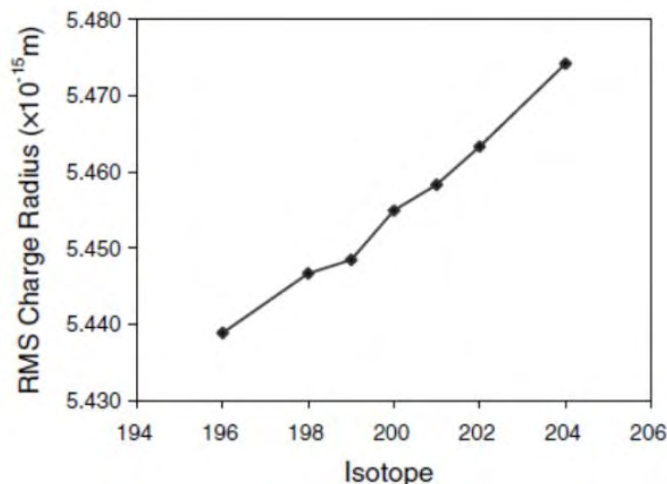


Figure 20 : Moyennes quadratiques (RMS) du rayon des isotopes stable du Hg (Schauble, 2007).

Le rayon nucléaire ($\langle r^2 \rangle$) des isotopes 199 et 201 est plus proche des isotopes 198 et 200 au lieu d'être au milieu des deux noyaux voisins. Cette petite taille relative conduit à une densité de charge plus grande dans le noyau. Ainsi, les orbitales électroniques s et p seront plus fortement liées au noyau ne laissant que très peu d'énergie d'attraction aux « lointaines » orbitales d et f. Les deux principaux états d'oxydation du Hg (0 et II) ont 0 ou 2 électrons dans l'orbitale 6s. A l'équilibre, les isotopes pairs seront plus stables lorsqu'ils auront une densité d'électrons plus faible autour du noyau (Hg^{2+}) parce que l'orbitale de valence 5d sera liée plus fortement. Les isotopes impairs seront plus stables dans le cas où ils auront une densité d'électrons plus forte autour du noyau (Hg^0) parce que leur orbitale de valence 6s sera liée plus fortement. Si tous les isotopes sont sous la forme de mercure élémentaire, les isotopes impairs forment des liaisons covalentes faibles et sont plus volatils (Bigeleisen, 1996a; Rose, 2010; Schauble, 2007). Ce fractionnement est en théorie quantifiable en calculant le facteur β_{NVE} défini par (Schauble, 2007):

$$\beta_{\text{NVE}} = \frac{(\langle r_1^2 \rangle - \langle r_2^2 \rangle)}{(\langle r_1^2 \rangle - \langle r_3^2 \rangle)}$$

Schauble a modélisé le fractionnement isotopique dû aux effets de volume nucléaire pour les isotopes de Hg en utilisant les rayons nucléaires donnés par (Angeli, 2004) et a montré des variations isotopiques indépendantes de la masse pour les isotopes ^{199}Hg , ^{201}Hg et ^{204}Hg . En 2008, Gosh démontre une divergence entre les données de rayon nucléaire de ^{204}Hg entre (Hahn et al., 1979) et (Angeli, 2004). L'anomalie sur l'isotope 204 n'est plus attendue. Avec un écart de son rayon nucléaire ($\langle r^2 \rangle$) à la droite plus important (Figure 20), on s'attend à un effet plus fort du NVE sur l'isotope 199

que sur l'isotope 201. A partir des facteurs de fractionnement calculés par Schauble pour plusieurs espèces, il ressort une relation linéaire entre les anomalies $\Delta^{199}\text{Hg}$ et $\Delta^{201}\text{Hg}$ avec une pente allant de 1.65 à 2.7 (Sonke, 2011).

Observations expérimentales du NVE

En parallèle de ces études théoriques, des études expérimentales ont été parallèlement menées. Les plus pertinentes sont les expérimentations d'évaporation de Hg^0 métallique liquide (Estrade et al., 2009; Ghosh et al., 2013). Avec des conclusions similaires (ratio $\Delta^{199}\text{Hg}/\Delta^{201}\text{Hg}$, voir Partie 2.2.1), ces études ont permis une compréhension plus concrète du mécanisme de volume nucléaire. L'étude d'Estrade et al. (2009) est décrite sur la figure 21.

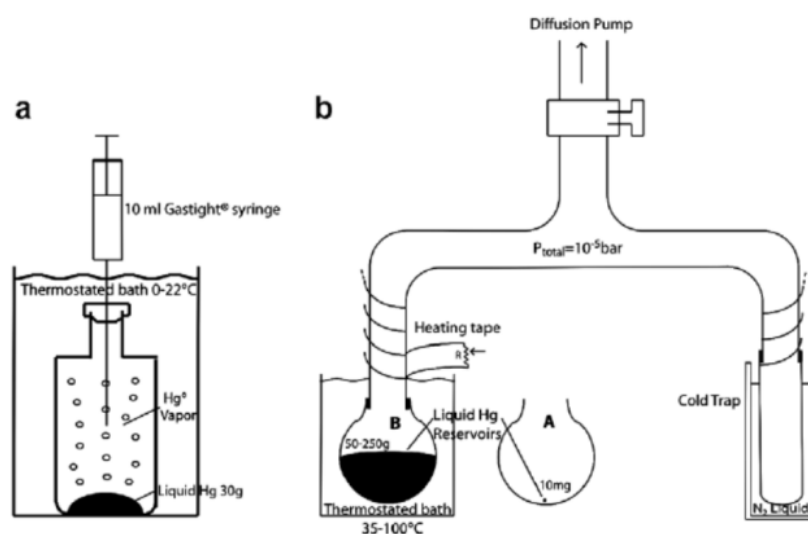


Figure 21 : représentation schématique de l'expérience d'Estrade et al. a) Evaporation à l'équilibre : 30g de Hg liquide est introduit dans un tube de 40 mL. La vapeur saturée est prélevée après 24h d'équilibre à différentes températures. b) Evaporation dynamique: du Hg liquide est évaporé sous vide (10^{-5} bar), la vapeur est re-condensée sur un piège froid. D'après (Estrade et al., 2009)

Les deux expérimentations menées (équilibre et dynamique) ont révélé que les isotopes légers étaient privilégiés lors de l'évaporation. Le forçage de la réaction par le vide accroît cet effet conduisant à un facteur de fractionnement $\epsilon_{\text{MDF}}^{202} = -6.68\%$ (contre $\epsilon_{\text{MDF}}^{202} = -0.86\%$ à l'équilibre). Ces résultats sont très semblables à ceux obtenus par Brønsted et von Hevesy dans les années 1920 ($\epsilon_{\text{MDF}}^{202} = -7.6\%$) avec des moyens analytiques forcément plus sommaires. Très récemment Ghosh et al. (2013) ont reconduit l'expérience et ils obtiennent un $\epsilon_{\text{MDF}}^{202} = -0.7$ à -1.3% à l'équilibre. Estrade et al. observent une pente entre $\Delta^{201}\text{Hg}$ et $\Delta^{199}\text{Hg}$ de 2.0 ± 0.5 , non-significativement différente de 1.59 ± 0.05 récemment observé par (Ghosh et al., 2013).

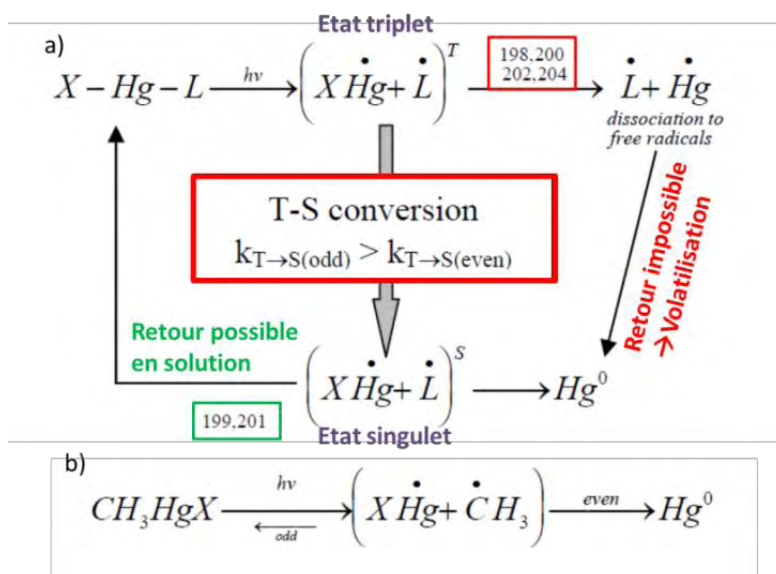
2.1.3.3. Nuclear spin ou Magnetic Isotope Effect

Théorie

Le second mécanisme produisant du MIF est le « magnetic isotope effect » (MIE). Il a été observé pour la première fois en 1976 par Buchachenko et al., pour le ^{13}C lors de la décomposition du dibenzyl ketone (Buchachenko et al., 1976). Il a ensuite été proposé par Bergquist et Blum en 2007 pour expliquer le MIF observé durant la photo réduction du Hg inorganique ou MMHg (Bergquist and Blum, 2007). Le MIE est un mécanisme de fractionnement isotopique cinétique qui est exprimé lors de réactions radicalaires (Grissom, 1995; Turro, 1983).

Lorsque le nombre de neutrons du noyau est impair, on a ce que l'on appelle un spin nucléaire non nul formant un champ magnétique dans le noyau. En ce qui concerne le Hg, ce phénomène se produit pour les isotopes ^{199}Hg et ^{201}Hg qui possèdent un spin nucléaire de $+1/2$ et $+3/2$ et un moment magnétique de $+0.5029$ et -0.5602 μB respectivement. Les interactions entre le moment magnétique du noyau et celui des électrons sont appelées couplage hyperfin, ces derniers sont si petits qu'ils n'ont aucun effet sur les caractéristiques des systèmes chimiques à l'équilibre (Bigeleisen, 1996a). Ils peuvent cependant entraîner un effet cinétique en permettant à des isotopes ayant des spins nucléaires différents de réagir à différentes vitesses. L'effet MIE est visible pendant les réactions radicalaires où les réactants absorbent l'énergie photonique ou thermique pour produire une paire de radicaux $\text{R}\bullet\bullet\text{R}$ (e^- sur couche s de valence=1). A ce moment-là on dit que l'on est à l'état « triplet » interdisant tout retour à l'état initial. Seule une conversion triplet-singulet peut reformer la molécule. C'est à ce moment que le spin non nul peut accélérer la transition vers l'état singulet et reformer plus facilement la molécule d'origine en recombinant la paire radicalaire. Ainsi pour le Hg, les radicaux impliquant ^{199}Hg et ^{201}Hg vont se recombiner plus facilement à la suite d'une dissociation photochimique par exemple. Ce mécanisme est schématisé dans la Figure 22.

Figure 22 : Proposition de mécanisme pour expliquer le MIE lors de la a) photoréduction du Hg inorganique, b) photodéméthylation de MMHg. Adapté de (Bergquist and Blum, 2007; Bergquist and Blum, 2009; Rose, 2010).



Observation expérimentale du MIE

La première démonstration d'un processus induisant du MIF chez le Hg a été réalisée lors d'expérimentations de la réduction photochimique de Hg^{2+} et MMHg en présence de matières organiques dissoutes dans l'eau sous l'action de lumière naturelle solaire (Figure 23, (Bergquist and Blum, 2007)). Les isotopes impairs étaient préférentiellement retenus dans la phase aqueuse provoquant la formation d'anomalies jusqu'à 2%. L'examen des ratios $\Delta^{199}\text{Hg}/\Delta^{201}\text{Hg}$ a révélé des différences entre l'expérience de réduction du Hg^{2+} ($\Delta^{199}\text{Hg}/\Delta^{201}\text{Hg}=1.00\pm 0.02$) et la déméthylation du MMHg ($\Delta^{199}\text{Hg}/\Delta^{201}\text{Hg}=1.36\pm 0.03$). Les auteurs suggèrent que le mécanisme causant ce MIF est le MIE ce qui est compatible avec le mécanisme radicalaire évoqué précédemment. La photodéméthylation du MMHg est plus sensible au MIE que la photoréduction du Hg^{2+} car la scission de la liaison Hg-C peut produire des paires de radicaux additionnels ($\bullet\text{CH}_3$ et $\bullet\text{HgCl}$) en plus de ceux produits par les composés MMHg-DOM (Liu et al., 2011). Ainsi dans les mêmes conditions, la photodéméthylation produit un $\epsilon_{\text{MIF}}^{199}$ de -3.6‰, bien plus haut que $\epsilon_{\text{MIF}}^{199}=-0.6‰$ observé pour Hg^{2+} (Bergquist and Blum, 2007).

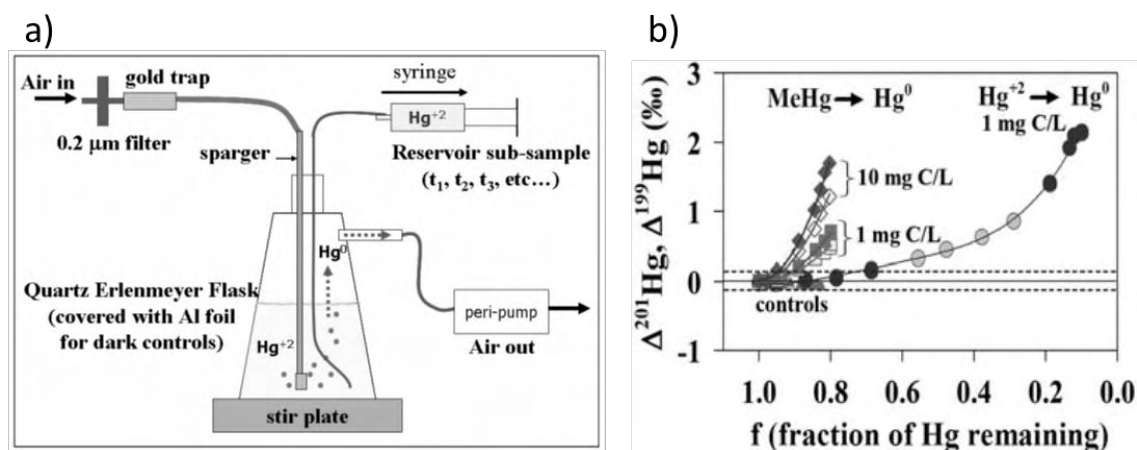


Figure 23 : a) Représentation schématique de l'expérimentation de photoréduction de Hg^{2+} en milieu aqueux. b) Anomalie isotopique ($\Delta^{199}\text{Hg}$ et $\Delta^{201}\text{Hg}$) de la phase aqueuse au cours de la réaction.

2.1.3.4. Self-shielding

L'effet de « self-shielding » (SEE), bien que très certainement très marginal, pourrait être à l'origine des plus forts facteurs de fractionnement isotopiques dans la nature. Il a été observé très récemment lors d'une étude originale du fractionnement isotopique des différentes formes du Hg présentes dans les lampes fluoro-compactes (CFL, Figure 24, (Mead et al., 2013)). Brièvement la lampe contient une petite gouttelette de Hg^0 liquide en équilibre avec du Hg vapeur. La lumière est générée en excitant ce Hg^0 vapeur par un courant électrique. Quand le Hg retourne à son état initial il émet un photon UV caractéristique qui va s'absorber sur la paroi de la lampe préalablement couverte d'une couche de phosphore. Ensuite le phosphore réémet de la lumière dans le visible. Pendant

l'utilisation une partie du Hg^0 excité perdra son électron devenant Hg^+ et peut ainsi s'absorber sur les parois (<1%).

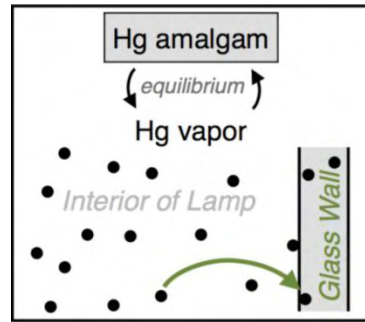


Figure 24 : Représentation schématique d'une lampe CFL. D'après (Mead et al., 2013).

La signature isotopique du Hg absorbé sur les parois a été comparée à celle du Hg total présent dans la lampe (Figure 25). On observe des anomalies extrêmes pour tous les isotopes allant de $\Delta^{199} = -16.3\text{‰}$ jusqu'à $\Delta^{204} = 18.3\text{‰}$ (Mead et al., 2013). Par comparaison du fractionnement attendu par MIE et par SEE, les données semblent se rapprocher plus d'un mécanisme de SEE. Il est régi par la structure hyperfine du spectre d'absorption du Hg, notamment celle de la raie à 254nm. En raison des différences de masses et de spins entre les 7 isotopes du Hg, la raie d'absorption à 254nm est divisée en 10 composantes. Sous les conditions de la CFL, la chaleur engendre une plus grande probabilité de collision particulière réduisant ces composantes à 6. Dans ces 6 composantes, 3 sont composées de raies mono-isotopiques, les 3 restantes sont multi-isotopiques (Sommerer, 1993). Les facteurs de transmission de chaque ligne sont faibles mais différents ce qui génère un fractionnement des isotopes. Ce mécanisme ne suit pas la séparation isotope pair/impair, mais plutôt il privilégie l'ionisation de l'isotope le moins abondant lequel ainsi a tendance de s'enrichir avec le temps sur la paroi de la lampe.

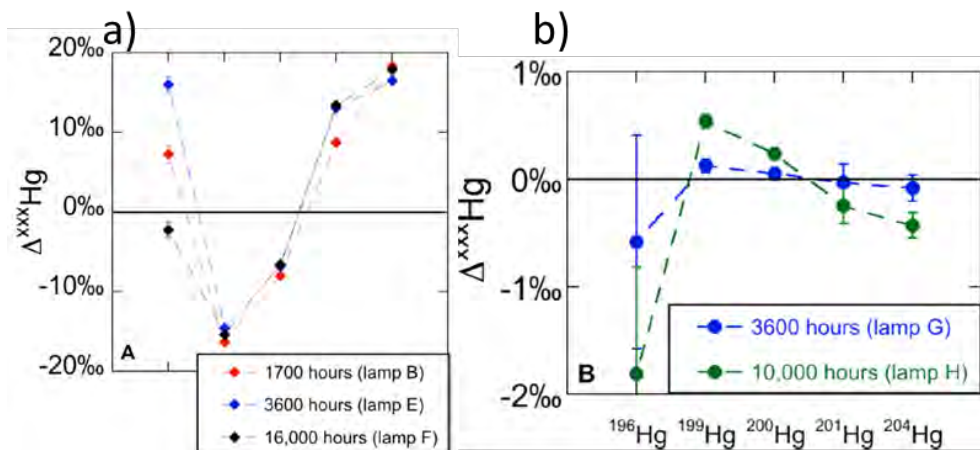


Figure 25 : Valeur de MIF observées a) dans le Hg piégé sur les parois de la lampe, b) dans le Hg total présent dans la lampe (excepté celui piégé sur les parois). Différents temps d'utilisation des lampes sont indiqués. D'après (Mead et al., 2013).

Auparavant, ce phénomène avait déjà été observé lors de fractionnement isotopique du CO dans la nébuleuse solaire (Lyons and Young, 2005). Provoquant à la fois des anomalies sur les isotopes pairs et impairs, le phénomène de SEE pourrait être à l'origine des anomalies $\Delta^{200}\text{Hg}$ (jusqu'à 1.24‰) observées par Chen et al. (2012) dans les précipitations atmosphériques (Chen et al., 2012). Cependant les anomalies des autres isotopes ne correspondent pas avec celles attendues lors d'un SSE. Dans la nature il apparaît que ce mécanisme doit-être extrêmement rare et non représentatif du fait des conditions particulières requises (UV, Hg^0 vapeur concentré). Il peut toutefois être utilisé pour déterminer le devenir de Hg^0 provenant des déchets de lampe CFL par exemple. La mobilité du Hg absorbée sur les parois n'est pas connue et il se peut que leurs impacts soient limités géographiquement. Cette étude originale a le mérite de montrer qu'il reste beaucoup de mécanismes à découvrir qui fractionnement les isotopes du Hg.

2.2. Fractionnements isotopiques dans l'environnement

2.2.1. Mécanismes et réactions à l'origine de fractionnements isotopiques

Depuis que des mesures précises de fractionnement isotopique sont possibles par MC-ICPMS, les études expérimentales se sont multipliées afin de décrire le fractionnement isotopique des différentes réactions. Bien que des calculs théoriques permettent en principe de calculer les facteurs de fractionnements à l'équilibre de nombreuses réactions (Schauble, 2007; Valley and Cole, 2001), les études expérimentales sont indispensables particulièrement pour les processus photochimiques et biotiques incluant plusieurs étapes intermédiaires et impliquant des espèces non connues. Une revue des principales études est présentée dans la Table 5.

Chapitre 2. Les isotopes stables du mercure

Table 5 : Revue des différentes études expérimentales portant sur le fractionnement isotopique (MDF et MIF) lors de transformations chimiques, biologiques et physiques. Adapté, modifié et mis à jour de (Liu et al., 2011; Sonke, 2011).

Type	A (Réactif)	B (Produit)	Conditions	Effet isotopique	$\epsilon_{\text{MDF}}^{202}$ (‰)	$\epsilon_{\text{MIF}}^{199}$ (‰)	$\Delta^{199}\text{Hg}/\Delta^{201}\text{Hg}$	Référence
Réactions cinétiques abiotiques, photochimiques								
Photo-réduction	$\text{Hg}^{2+}_{(\text{aq})}$	$\text{Hg}^0_{(\text{g})}$	DOC=SRFA Hg/DOC=60000 -100000 ng.mg ⁻¹ Lumière naturelle	MDF, (+)MIE	-0.60	-0.60	1.00±0.02	(Bergquist and Blum, 2007)
	$\text{Hg}^{2+}_{(\text{aq})}$	$\text{Hg}^0_{(\text{g})}$	DOC=Lake DOM Hg/DOC=8330ng.mg ⁻¹ Lumière naturelle et lampe Xe	MDF, (+)MIE	-1.06	-1.94	1.19-1.31	(Zheng and Hintelmann, 2009)
	$\text{Hg}^{2+}_{(\text{aq})}$	$\text{Hg}^0_{(\text{g})}$	En présence de Cystéine (avec soufre), ligand/Hg=2000, lampe Xe	MDF, (-)MIE	-1.32	0.69	1.46±0.03	(Zheng and Hintelmann, 2010a)
	$\text{Hg}^{2+}_{(\text{aq})}$	$\text{Hg}^0_{(\text{g})}$	En présence de Sérine (sans soufre), ligand/Hg=2000, lampe Xe	MDF, (+)MIE, NFS	-1.71	-0.26	1.10-1.67	(Zheng and Hintelmann, 2010a)
	$\text{Hg}^{2+}_{(\text{aq})}$	$\text{Hg}^0_{(\text{g})}$	En présence d'acide formique, lampe Hg (UVC, $\lambda=254$)	MDF, NFS	-0.55	-	-	(Yang and Sturgeon, 2009)
	$\text{Hg}^{2+}_{(\text{aq})}$	$\text{Hg}^0_{(\text{g})}$	Photoréduction de Hg^{2+} à la surface de la neige	MDF, (-)MIE	-	$\epsilon_{\text{neige-air}}^{199} = -3.41$	1.07	(Sherman et al., 2010)
Photo-déméthylation	$\text{CH}_3\text{Hg}^+_{(\text{aq})}$	$\text{Hg}^0_{(\text{g})}$	DOC=SRFA Hg/DOC=66200 ng.mg ⁻¹ Lumière naturelle	MDF, (+)MIE	-1.3	-3.32	1.36±0.02	(Bergquist and Blum, 2007)
	$\text{CH}_3\text{Hg}^+_{(\text{aq})}$	$\text{Hg}^0_{(\text{g})}$	DOC=SRFA Hg/DOC=9350 -100000 ng.mg ⁻¹ Lumière naturelle	MDF, (+)MIE	-1.70	-7.93	-	(Malinovsky et al., 2010)
	$\text{CH}_3\text{Hg}^+_{(\text{aq})}$	$\text{Hg}^0_{(\text{g})}$	Lampe Hg (UVC, $\lambda=254$)	MDF, (+)MIE	-0.13 à -0.36	-	-	(Malinovsky et al., 2010)
Réactions cinétiques abiotiques, non-photochimiques								
Réduction	$\text{Hg}^{2+}_{(\text{aq})}$	$\text{Hg}^0_{(\text{g})}$	DOC= Lake DOM Hg/DOM=10000 ng.mg ⁻¹ , dans le noir	MDF, NFS	-1.52	-0.19	-	(Zheng and Hintelmann, 2010b)
	$\text{Hg}^{2+}_{(\text{aq})}$	$\text{Hg}^0_{(\text{g})}$	SnCl_2	MDF, NFS	-1.56	-0.22	1.59-1.62	(Zheng and Hintelmann, 2010b)
	$\text{Hg}^{2+}_{(\text{aq})}$	$\text{Hg}^0_{(\text{g})}$	SnCl_2 et NaBH_4	MDF, NFS	-0.43 à -0.49	-	-	(Yang and Sturgeon, 2009)
Ethylation abiotique	$\text{Hg}^{2+}_{(\text{aq})}$	$\text{EtHg}^+_{(\text{g})}$	Abiotique, réactif= NaBH_4	MDF	-1.2	-	-	(Yang and Sturgeon, 2009)
Volatilisation	$\text{Hg}^0_{(\text{aq})}$	$\text{Hg}^0_{(\text{g})}$	Hg^0 dissous dans l'eau vers Hg^0 vapeur	MDF	-0.47	-	-	(Zheng et al., 2007)

Chapitre 2. Les isotopes stables du mercure

Evaporation cinétique	$\text{Hg}^0_{(l)}$	$\text{Hg}^0_{(g)}$	Premières observations de fractionnement isotopique du Hg	MDF, NFS	-7.6	-	-	(Brönsted and Hevesy, 1920; Mulliken and Harkins, 1922)
	$\text{Hg}^0_{(l)}$	$\text{Hg}^0_{(g)}$	Evaporation sous vide de Hg^0 métallique	MDF, NFS	-6.68	-	-	(Estrade et al., 2009)
Méthylation	$\text{Hg}^{2+}_{(aq)}$	$\text{CH}_3\text{Hg}^+_{(aq)}$	Méthylcobalamine	MDF	-4.0	-	-	(Jiménez-Moreno et al., 2013)
Méthylation	$\text{Hg}^{2+}_{(aq)}$	$\text{CH}_3\text{Hg}^+_{(aq)}$	Méthylcobalamine	MDF	-0.5 à -1.5	-	-	(Malinovsky and Vanhaecke, 2011)
Equilibre abiotique								
Complexation de Hg^{2+} avec des groupements thiols	Hg^{2+}	Hg^{2+} -Thiol	Hg^{2+} chloré en Hg^{2+} -thiol	MDF, NFS	-0.53	-	1.54±0.44	(Wiederhold et al., 2010)
			Hg^{2+} nitrate en Hg^{2+} -thiol	MDF, NFS	-0.67	-	-	
Evaporation à l'équilibre	$\text{Hg}^0_{(l)}$	$\text{Hg}^0_{(g)}$	Equilibre entre Hg^0 métallique et la vapeur de Hg^0 à 22°C	MDF, NFS	-0.86	-	2.0±0.5	(Estrade et al., 2009)
	$\text{Hg}^0_{(l)}$	$\text{Hg}^0_{(g)}$	Equilibre entre Hg^0 métallique et la vapeur de Hg^0 à 25°C	MDF, NFS	-0.7 à -1.3	-	1.59±0.05	(Ghosh et al., 2013)
Réaction cinétique biotique								
Réduction microbienne de Hg^{2+}	$\text{Hg}^{2+}_{(aq)}$	$\text{Hg}^0_{(g)}$	E.Coli JM109/pPB117, variation avec la température	MDF	-1.40	-	-	(Kritee et al., 2007)
			Bactérie résistante au Hg^{2+} . <i>Bacillus cereus</i> Strain 5 et <i>Anoxybacillus sp</i> Strain FB9	MDF	-1.20	-	-	(Kritee et al., 2008)
			Bactérie sensible au Hg^{2+} . <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	MDF	-1.80	-	-	(Kritee et al., 2008)
Méthylation bactérienne	$\text{Hg}^{2+}_{(aq)}$	$\text{CH}_3\text{Hg}^+_{(aq)}$	<i>Desulfobulus propionicus</i> , condition anaérobiques dans le noir, source de carbone=pyruvate	MDF	-2.60	-	-	(Rodríguez-González et al., 2009)
Déméthylation bactérienne	$\text{CH}_3\text{Hg}^+_{(aq)}$	$\text{Hg}^{2+}_{(aq)}$	<i>E.Coli</i> , JM109/pPB117	MDF	-0.40	-	-	(Kritee et al., 2009)
Autres								
Emissions volcaniques	$\text{Hg}^0_{(p)}$	$\text{Hg}^0_{(g)}$	Vulcano Island (Italie)	MDF	1.3	-	-	(Zambardi et al., 2009)
Transfert trophique	$\text{CH}_3\text{Hg}^+_{(nourriture)}$	$\text{CH}_3\text{Hg}^+_{(poisson)}$	Expérimentations contrôlées en aquariums Espèces considérées= <i>Perca flavescens</i> , <i>Salvelinus namaycush</i>	-	0.0	-	-	(Kwon et al., 2012)
Combustion	$\text{Hg}_{(charbon)}$	$\text{Hg}_{(émission)}$	Charbon	MDF	0.3	-	-	(Sun et al., 2013)
	$\text{Hg}_{(minerais)}$	$\text{Hg}_{(calcinats)}$	Minerais	MDF	0.8	-	-	(Yin et al., 2013)

2.2.1.1 Etude des réactions cinétiques abiotiques

A l'origine des forts facteurs de fractionnements indépendants et dépendants de la masse, les réactions photochimiques semblent primordiales dans le domaine de l'isotopie du Hg. En termes de MDF, ces réactions suivent les lois de fractionnements cinétiques classiques et favorisent la réduction des isotopes légers laissant dans le compartiment aqueux un pool de Hg riche en isotope lourds. Le résultat est l'observation de facteurs de fractionnements allant de $\epsilon_{\text{MDF}}^{202} = -0.55\text{‰}$ à $\epsilon_{\text{MDF}}^{202} = -1.7\text{‰}$. Comme démontré plus tôt dans ce manuscrit, les réactions photochimiques ont été étudiées de façon étendue du fait de leur implication présumée importante dans la production de MIF de grande amplitude. Avec les facteurs des fractionnements élevés ($\epsilon_{\text{MIF}}^{199}\text{Hg}^{2+} = -0.60\text{‰}$, $\epsilon_{\text{MIF}}^{199}\text{MMHg} = -3.35\text{‰}$, Table 5, (Bergquist and Blum, 2007)) dû à un fort MIE engendré, la réduction/déméthylation photochimique est le seul procédé connu jusqu'à présent qui est capable de produire d'importantes anomalies isotopiques dans des réservoirs naturels. Il a été proposé que les signatures MIF dans les réseaux trophiques aquatiques soient à l'origine produites dans les eaux de surfaces par des réactions photochimiques et transférées par la suite dans les chaînes trophiques par l'intermédiaire de l'ingestion de nourriture et par bioaccumulation du MMHg résiduel dans l'eau (Bergquist and Blum, 2007). Cette particularité fait de la mesure du MIF dans les échantillons biologiques un moyen d'investigation intéressant pour comprendre la réaction photochimique du Hg dans la colonne d'eau.

Cependant, toutes les études expérimentales se sont intéressées à présent qu'au fractionnement isotopique du Hg lors de réactions photochimiques dans l'eau douce. La prochaine étape sera leur étude dans les environnements marins. En effet, les études environnementales marines se succèdent, cette thèse en fait partie. Elles se basent uniquement sur les données expérimentales dans l'eau douce pour les interprétations ce qui présente un niveau d'extrapolation élevé à prendre en compte (Day et al., 2012; Point et al., 2011; Senn et al., 2010).

2.2.1.2. Réduction abiotique non-photochimique du Hg

La réduction abiotique en l'absence de lumière est un processus omniprésent dans les eaux naturelles et dans les sols. Le fractionnement isotopique engendré est dominé par le MDF et NVE. En effet, le plus grand NVE observé a été mesuré lors de la réduction abiotique (en absence de lumière) de HgCl_2 par la matière organique dissoute naturelle ou SnCl_2 (Zheng and Hintelmann, 2010b). Des anomalies négatives allant jusqu'à $\Delta^{199}\text{Hg} = -0.6\text{‰}$ ont été observées après réduction de 98% de Hg^{2+} initialement présentes. Dans les conditions naturelles où le degré de réduction n'est pas aussi fort, $\Delta^{199}\text{Hg}$ pourrait atteindre -0.3‰ (réduction de 70%) (Liu et al., 2011). La contribution relative du MDF et NVE au facteur de fractionnement global dépend de la longueur des liaisons et de la densité électronique. Pour la réduction de HgCl_2 ces deux contributions ont été estimées à 40% et 60% respectivement (Zheng and Hintelmann, 2010b). Trois processus ont été identifiés comme générateurs

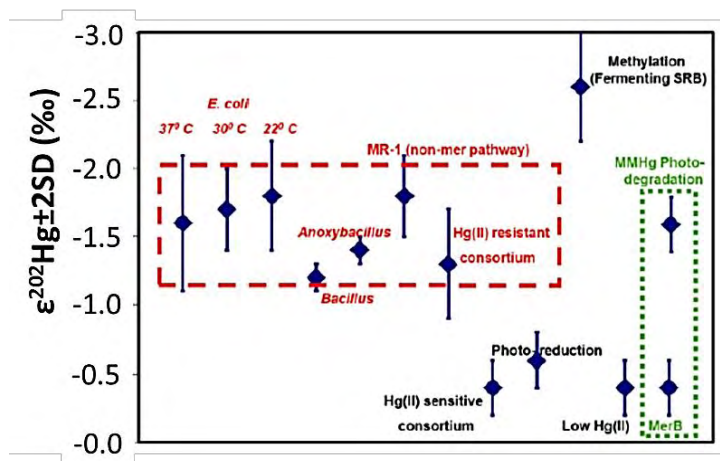
de NVE : l'évaporation, la complexation, et la réduction. La réduction génère les plus grandes anomalies et donc potentiellement un NVE plus fort. L'amplitude du NVE est en fait la mesure du changement de densité électronique sur la couche de valence 6s. Ainsi le changement par gain ou perte d'électrons durant les réactions redox est plus élevé que dans les réactions d'évaporation ou de complexation qui ne changent pas l'état d'oxydation du Hg (Liu et al., 2011). Avec un nombre différent d' e^- échangés, le NVE est aussi affecté par la nature du ligand. En théorie, la complexation avec les groupements thiol, chlore ou hydroxyles peut générer du NVE de différentes amplitudes (Wiederhold et al., 2010).

Les réductions abiotiques non-photochimiques peuvent être facilement distinguées des réductions photochimiques car sans MIE elles génèrent un MIF significativement plus faible. Il existe aussi une différence au niveau de la pente $\Delta^{199}\text{Hg}$ vs $\Delta^{201}\text{Hg}$ qui est plus élevée en NVE (≈ 1.6) comparée au MIE ($\approx 1-1.3$). Ces distinctions permettent souvent de bien différencier les deux mécanismes. Il faut cependant garder à l'esprit que les processus mis en évidence en laboratoire représentent souvent une approximation de processus plus complexes et couplés dans la nature. Aussi la réduction photochimique du Hg est souvent accompagnée d'une réduction concurrente non-photochimique (Zheng and Hintelmann, 2010b). Ainsi la mesure de la pente de $\Delta^{199}\text{Hg}$ vs $\Delta^{201}\text{Hg}$ reflète probablement un mélange de MIE et de NVE à plus faible contribution. De plus, des processus non-observés à ce jour en laboratoire peuvent potentiellement contrôler de façon significative le MIF observé dans les échantillons prélevés.

2.2.1.3. Réduction et déméthylation bactérienne de $\text{Hg}^{2+}/\text{MMHg}$

Les études expérimentales mesurant le fractionnement engendré par les réactions réduction/déméthylation bactériennes de $\text{Hg}^{2+}/\text{MMHg}$ en Hg^0 sont probablement à présent les plus nombreuses ; elles ont été récemment résumées par Kritee et al. (Figure 26, (Kritee et al., 2013)).

Figure 26 : Résumé des facteurs de fractionnements observés dans les expérimentations de réduction de Hg^{2+} et de déméthylation de MMHg par voie biotique. Les expériences de photo-réduction et photo-déméthylation de Bergquist (2007) ont été ajoutées (Bergquist and Blum, 2007). Modifié de (Kritee et al., 2013).



Réduction bactérienne

La première étude du genre a été menée par Kritee et al. en 2007 sur des bactéries possédant l'enzyme merA et résistantes à de fortes concentrations en Hg²⁺. Ils ont observés un MDF lors de la réduction du Hg²⁺ en Hg⁰ allant de $\epsilon_{\text{MDF}}^{202}\text{Hg}=-1.3$ à $\epsilon_{\text{MDF}}^{202}\text{Hg}=-2.0\%$. Ce fractionnement est similaire à celui observé lors i) de la photoréduction du MMHg ($\epsilon_{\text{MDF}}^{202}\text{Hg}=-1.3$ à -1.7% , (Bergquist and Blum, 2007)) ii) de la réduction dans le noir de Hg²⁺ en présence de matière organique ($\epsilon_{\text{MDF}}^{202}\text{Hg}=-1.52\%$, (Zheng and Hintelmann, 2010b)) ii) de la réduction de Hg²⁺ par SnCl₂ ($\epsilon_{\text{MDF}}^{202}\text{Hg}=-1.56\%$, (Zheng and Hintelmann, 2010b)). Les études suivantes ont diversifiées les conditions d'expérimentation en comparant bactéries gram +/- (différente paroi cellulaire), bactéries résistantes ou non (mer ou non) et en diversifiant les donneurs d'électrons (acétate, oxygène/fumarate pyruvate, lactate). Globalement très peu de différences ont été observées dans les fractionnements isotopiques engendrés (figure 26). Seul le cas des bactéries sensibles au Hg²⁺ montrent des différences avec un $\epsilon_{\text{MDF}}^{202}\text{Hg}=-1.8\%$ pour la bactérie *Shewanella oneidensis MR-1* (Kritee et al., 2008) et $\epsilon_{\text{MDF}}^{202}\text{Hg}=-0.4\%$ dans un consortium naturel de bactéries sensibles (Kritee et al., 2013).

En résumé, les bactéries réduisent préférentiellement les isotopes légers du Hg générant uniquement un MDF d'amplitude moyenne $\epsilon_{\text{MDF}}^{202}=-1.6\pm 0.5\%$ (Kritee et al., 2013). Ainsi les études expérimentales microbiologiques ont donc permis de définir un fractionnement moyen lors d'études de souches pures. Les prochaines étapes seront de se rapprocher des conditions naturelles en mixant différentes souches et travailler à l'échelle de communautés bactériennes en solution. Une première étude a été réalisée par Kritee et al. où différentes souches résistantes et non résistantes au Hg²⁺ ont été mélangées. Les facteurs de fractionnement atteignent respectivement $\epsilon_{\text{MDF}}^{202}=-1.4\pm 0.4\%$ et $\epsilon_{\text{MDF}}^{202}=-0.4\pm 0.2\%$.

Déméthylation bactérienne

La déméthylation du MMHg est elle aussi composée de plusieurs étapes avec entre autre le clivage de la liaison Hg-C par organomercurial-lyase *MerB* comme première étape primordiale. Elle est suivie ensuite de la réduction du Hg²⁺ en Hg⁰ par la *mercuric reductase MerA* (Kritee et al., 2009). Contrairement à la réduction du Hg²⁺, les auteurs suggèrent que le fractionnement lors de la déméthylation proviendrait majoritairement de la première étape limitante de lyse. Comme pour la réduction du Hg²⁺ ce processus est supposé être à l'origine de MDF uniquement d'amplitude $\epsilon_{\text{MDF}}^{202}\text{Hg}=-0.4\%$. Vu le faible nombre d'études portant sur le fractionnement isotopique lors de la déméthylation bactérienne du MMHg il nécessaire de considérer ce facteur de fractionnement comme indicatif.

Pour ces deux mécanismes, pas de MIE n'a pu être observé, ce qui semble logique étant donné la nécessité de formation de radicaux libres intermédiaires. Ces composés n'ont jamais été

observés lors des multiples études ce qui confirme l'absence de MIE dans les transformations biologiques (Kritee et al., 2009; Liu et al., 2011; Melnick and Parkin, 2007). L'absence de MIF sépare clairement les processus biologiques des processus photochimiques. Cette distinction permet ainsi au MIF d'être utilisé comme outil très puissant pour différencier les voies de transformations biotiques et abiotiques dans la nature.

2.2.1.4. Méthylation bactérienne

Comme expliqué plus tôt dans le manuscrit, la méthylation du Hg est un processus primordial dans le cycle du Hg. La réaction est bien documentée mais le nombre d'études ayant tenté de mesurer son fractionnement isotopique sont très restreints. La principale contrainte vient du fait qu'il faut isoler le MMHg formé après méthylation dans la matrice. Les nouvelles techniques analytiques de chromatographie gazeuse couplées à un MC-ICPMS (Hg-CSIA) ont permis la séparation en ligne des différentes espèces chimiques de Hg (Epov et al., 2008). Cette méthode a été utilisée par Rodriguez-Gonzalez en 2009 lors d'une expérimentation de méthylation de Hg^{2+} par une bactérie sulfato-réductrice (*Desulfobulbus propionicus*) dans le noir et en anoxie. Un facteur de fractionnement $\epsilon_{\text{MDF}}^{202}$ de -2.60‰ a été observé ce qui est bien supérieur à celui observé lors de méthylation abiotique en présence de methylcobalamine ($\epsilon_{\text{MDF}}^{202} = -0.5$ à -1.5‰) (Malinovsky and Vanhaecke, 2011). Comme pour la réduction/déméthylation bactérienne, il n'a pas été observé de MIF d'origine biotique lors des expérimentations. De plus, il a été montré que la bactérie *Desulfobulbus propionicus* pouvait aussi être à l'origine de déméthylation et le fractionnement observé serait alors le résultat net des deux processus antagonistes (Bridou et al., 2011; Perrot, 2012). Les observations de Rodriguez et al. révèlent aussi une forte dépendance au rapport MMHg/ Hg^{2+} dans le milieu aqueux, avec un MDF plus fort lorsque ce ratio augmente (Rodríguez-González et al., 2009).

2.2.1.5. Conclusion sur les études expérimentales

Pour conclure sur toutes ces expérimentations en laboratoire, on peut dire qu'elles permettent d'approcher et d'estimer les différentes réactions à l'origine de fractionnements isotopiques dans la nature. Elles sont indispensables pour l'interprétation des données isotopiques environnementales dans des échantillons naturels variés. L'amplitude du fractionnement ($\delta^{202}\text{Hg}$, $\Delta^{199}\text{Hg}$) mais aussi certains paramètres comme le ratio $\Delta^{199}\text{Hg}/\Delta^{201}\text{Hg}$ observé dans les différentes matrices environnementales sont le résultat de la signature isotopique initiale modifiée par le fractionnement isotopique de ces différentes réactions intermédiaires. Il reste cependant de nombreuses expériences à mener, dans différentes conditions expérimentales afin de mieux discriminer les différentes signatures observées dans la nature. Par exemple, dans le cadre de cette thèse, nous avons observé le manque crucial de données de fractionnement photochimiques dans des conditions d'eau de mer. Aucune donnée n'existe à ce sujet nous obligeant à considérer les processus de fractionnement obtenus dans l'eau douce.

2.2.2. Etudes environnementales des isotopes du Hg

2.2.2.1. MDF

Avec une variation totale d'environ 10‰ en $\delta^{202}\text{Hg}$ observée jusqu'à présent dans la nature (Figure 27), le fractionnement dépendant de la masse du Hg laisse entrevoir la possibilité de tracer et d'identifier différentes sources de Hg ainsi que ces mécanismes de transfert.

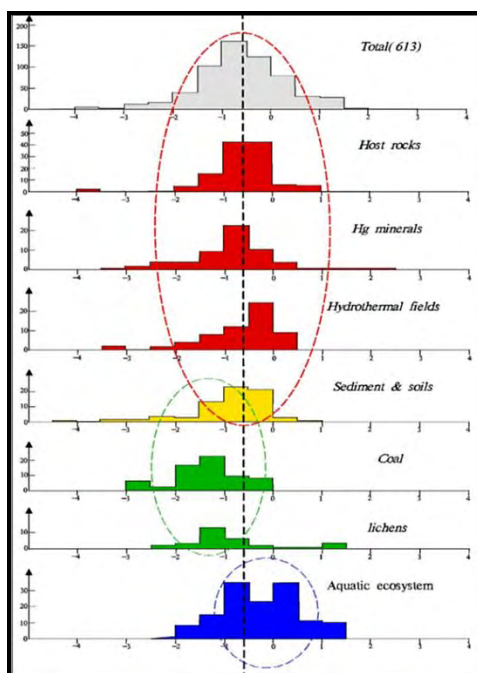


Figure 27 : Amplitude du fractionnement isotopique dépendant de la masse ($\delta^{202}\text{Hg}$) observé dans les différentes matrices. D'après Yin et al (Yin et al., 2010).

Avec ses nombreuses réactions redox, sa tendance à former des liaisons covalentes, son cycle biologique et ses changements de phases dû à sa forme volatile, le Hg est constamment soumis à des effets cinétiques ou d'équilibres isotopiques. Les premières études environnementales des isotopes du Hg se sont rapidement retrouvées confrontées à de larges variabilités isotopiques. Par exemple, la signature isotopique des systèmes hydrothermaux varie de -4‰ à 3‰ pour $\delta^{202}\text{Hg}$ (Sherman et al., 2009; Smith et al., 2008; Smith et al., 2005)). Alors que Sherman et al. (2009) ont conclu que de nombreux processus pouvaient engendrer des fractionnements isotopiques dans de tels systèmes (Sherman et al., 2009), Smith et al. ont identifiés que l'étape d'évaporation des fluides hydrothermaux, leur oxydation à la surface et la formation de minéraux (dont le cinabre, HgS) étaient d'importants processus de fractionnements isotopiques (Smith et al., 2005). Les isotopes légers sont préférentiellement émis dans la phase vapeur et remontent à la surface alors que les isotopes lourds restent dans la phase magmatique en profondeur. C'est ainsi qu'il a été observé des signatures isotopiques très variables dans les fluides hydrothermaux ($-3.5 \pm 0.1\%$ à $2.1 \pm 0.1\%$, (Smith et al., 2005)) comparés aux roches de la croûte terrestre ($-0.6 \pm 0.2\%$, (Bergquist and Blum, 2009; Smith et

al., 2008)). Une autre étude pionnière réalisée par Zambardi et al. (2009) a montré un fractionnement isotopique favorisant les isotopes lourds lors de l'oxydation de Hg^0 en Hg^{2+} sur les particules et aérosols dans les fumées volcaniques (Zambardi et al., 2009).

Biswas et al. (2008) ont montré des signatures isotopiques $\delta^{202}\text{Hg}$ allant de -2.8 à 0‰ dans les dépôts de charbon de différents pays (Biswas et al., 2008). Récemment Sun et al. ont estimé à $\approx -0.4\text{‰}$ la signature isotopique $\delta^{202}\text{Hg}$ des émissions de la centrale à charbon de Huainan City (Chine) pour un charbon d'origine disposant d'une signature $\delta^{202}\text{Hg} \approx -0.7\text{‰}$ (Sun et al., 2013). Les lichens et mousses qui représentent de bons intégrateurs du Hg atmosphérique, ont mis en évidence des valeurs de $\delta^{202}\text{Hg}$ très négatives allant jusqu'à -2‰ (Bergquist and Blum, 2009; Carignan et al., 2009). Les sols, sédiments et tourbes sont globalement plus négatifs avec un $\delta^{202}\text{Hg}$ allant jusqu'à -4‰ mais présentent aussi des valeurs positives allant jusqu'à 1‰ (Biswas et al., 2008; Foucher and Hintelmann, 2006; Ghosh et al., 2008). Les chaînes trophiques aquatiques, quant à elles, présentent des valeurs de $\delta^{202}\text{Hg}$ variant de -3‰ à 2‰ (Bergquist and Blum, 2007; Gantner et al., 2009; Laffont et al., 2009). Ces valeurs de $\delta^{202}\text{Hg}$ dans différents maillons d'une même chaîne alimentaire indiquent clairement un MDF lors de la bioaccumulation du MMHg entre 2 niveaux trophiques avec un enrichissement en isotopes lourds, le $\delta^{202}\text{Hg}$ augmentant de 1 à 2‰ entre la proie et le prédateur (Jackson et al., 2008; Laffont et al., 2009). Par exemple, une étude menée par Laffont et al. (2009) a consisté en l'analyse des isotopes du Hg dans les cheveux d'une population et dans les poissons constituant leur principale voie d'exposition (Laffont et al., 2009). L'anomalie $\Delta^{199}\text{Hg}$ (MIF) étant la même en moyenne que celle des poissons, Laffont et al. concluent en montrant qu'entre le poisson ingéré et l'être humain il n'y a pas de MIF mais un MDF d'environ 2 ‰ pour le $\delta^{202}\text{Hg}$ (Figure 28, (Laffont, 2009)).

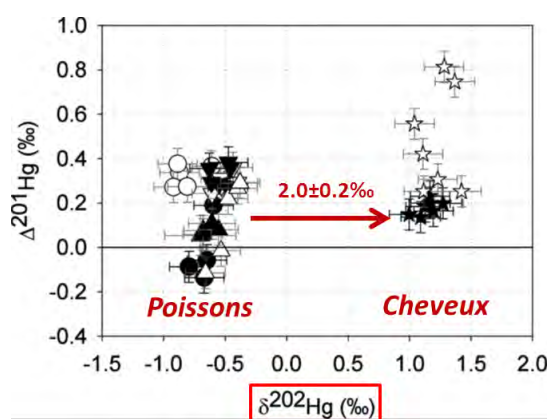


Figure 28 : Evidence d'un fractionnement isotopique de $\delta^{202}\text{Hg} = 2.0 \pm 0.2\text{‰}$ entre la signature isotopique d'échantillons de poissons (proies) et de cheveux (prédateurs). D'après (Laffont et al., 2009).

L'étude de Laffont et al. (2009) est l'une des plus spectaculaires concernant l'utilisation du fractionnement dépendant de la masse du Hg. L'enrichissement en isotopes lourds correspondrait à des

processus liés au métabolisme de Hg dans le corps humain et apportés par la consommation de poissons. L'association des isotopes du Hg avec des traceurs écologiques comme les isotopes du carbone et de l'azote se sont révélés comme des outils très complémentaires pour étudier les sources de transfert du Hg au sein des chaînes trophiques (Gantner et al., 2009; Perrot et al., 2010; Senn et al., 2010).

Malgré l'étude de Laffont et al. (2009), on peut constater que l'utilisation de la signature $\delta^{202}\text{Hg}$ pour faire du traçage de sources du Hg est délicate du fait du nombre de transformations et de réactions engendrant du MDF. Cette contrainte est accentuée par l'absence ou le faible nombre de mesures isotopiques dans les matrices environnementales peu concentrées en Hg (air, eau) obligeant à utiliser des proxys (lichens, mousses \rightarrow Hg atmosphérique, poissons) pour décrire la composition isotopique de ces compartiments. Seules quelques études très contraintes dans le nombre de réactions potentielles entre deux compartiments (exemple : proies-prédateurs ou différents organes, Chapitre 6) ont permis pour l'instant d'utiliser cette signature isotopique comme traceur de source ou de réactions métaboliques.

2.2.2.2. MIF

Pour le MIF, la variation de MIF naturelle observée jusqu'à présent est $\approx 10\%$ (Figure 29) entre certains échantillons de neige très négatifs ($\approx -5\%$, Alaska (Sherman et al., 2010)) et des échantillons dans certaines chaînes trophiques aquatiques montrent des valeurs très positives ($\approx 5\%$, Lac Baïkal (Perrot et al., 2012)).

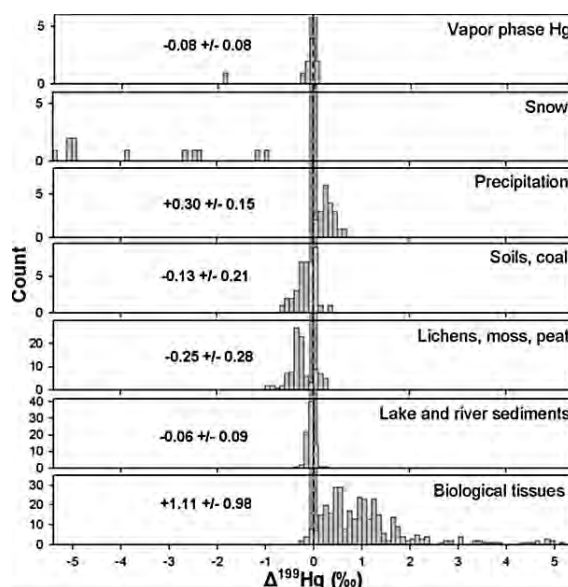


Figure 29 : Amplitude du fractionnement isotopique indépendant de la masse ($\Delta^{199}\text{Hg}$) observé dans différentes matrices/compartiments. D'après (Sonke, 2011).

Les anomalies observées chez les organismes aquatiques ont été rapidement expliquées comme étant le résultat de la réaction de la réduction/déméthylation photochimique de Hg^{2+} ou MMHg en Hg^0 en présence de DOM dans les eaux naturelles (Bergquist and Blum, 2007; Zheng and Hintelmann, 2009). Sauf cas particuliers à la surface de la neige et en présence de groupements soufrés dans l'eau, cette réaction favorise les isotopes pairs laissant dans le compartiment aquatique un pool de Hg enrichi en isotopes impairs (voir partie 2.1.3.3.). Inversement, la photoréduction du Hg est supposée être largement responsable de la signature du Hg atmosphérique. Le Hg^0 produit dans la colonne d'eau par photoréduction de Hg inorganique (ou MMHg) est appauvri en ^{199}Hg et ^{201}Hg dû au (+)MIE (ici le symbole '+' signifie l'enrichissement du MMHg ou Hg inorganique résiduel en isotopes impairs). Il porte donc une anomalie négative en $\Delta^{199}\text{Hg}$ et $\Delta^{201}\text{Hg}$. Un appauvrissement en isotopes impairs ($\Delta^{199}\text{Hg}$ allant jusqu'à -1‰) a été observé dans des bio-moniteurs de Hg atmosphériques, comme les lichens, sols, mousses ou tourbes (Carignan and Sonke, 2010; Estrade et al., 2010; Sonke, 2011). Plus récemment, des mesures de précipitations atmosphériques dans la région des Grands Lacs (USA) ont confirmé ces tendances avec des valeurs plutôt négatives allant de $\Delta^{199}\text{Hg} = -0.21$ à 0.06‰ (Gratz et al., 2010). Ces données sont complémentaires de celles observées dans le compartiment aquatique et suggèrent que la réduction ou déméthylation photochimique du Hg est le principal mécanisme à l'origine de l'enrichissement ou l'appauvrissement en isotopes impairs observé dans l'environnement (Sonke, 2011). Contrairement au MDF, le MIF ne semble pas affecté lors de l'assimilation/bioaccumulation/bioamplification du Hg (MMHg essentiellement) dans la chaîne trophique (Kwon et al., 2012; Laffont et al., 2009). Cela permet l'utilisation de proxys biologiques (ou bio-moniteurs) pour approcher la signature isotopique du Hg dans la colonne d'eau en attendant l'émergence de techniques de préconcentrations ou analytiques précises pour l'analyse d'échantillons présentant des niveaux de concentrations ultratracés. Ces caractéristiques font du MIF un outil très robuste comme traceur de sources de Hg (Blum et al., 2013a; Senn et al., 2010). La première étude a été menée par Bergquist et Blum en 2007 conjointement à l'expérience de photo-réduction du Hg^{2+} et photo-déméthylation du MMHg résumée plus tôt (Bergquist and Blum, 2007). Ils ont observés dans des poissons du lac Michigan des anomalies positives $\Delta^{199}\text{Hg}$ allant jusqu'à $\approx 5\text{‰}$. Ces résultats sont en accord avec la photo-déméthylation du MMHg ($\Delta^{199}\text{Hg}/\Delta^{201}\text{Hg} = 1.28 \pm 0.03$) permettant par des modèles de distillation de Rayleigh de déterminer la fraction de MMHg photo-déméthylée dans l'eau ($68 \pm 8\%$, 1SD) avant son incorporation dans la chaîne trophique. Même si ce calcul représente une première approximation il représente une des premières applications montrant comment l'utilisation des isotopes du Hg permet de quantifier des flux.

2.2.3. Etudes chez les organismes aquatiques

2.2.3.1. Fractionnement isotopique dans les chaînes trophiques

Jusqu'à présent toutes les études visant à approcher la signature isotopique du Hg dans l'eau ont été réalisées sur des échantillons biologiques afin d'utiliser la bio-amplification trophique du Hg comme système de préconcentration naturel. Cette méthode a d'ailleurs été suivie dans cette thèse avec l'utilisation de mammifères marins positionnés en bout de chaîne alimentaire. En attendant des techniques de mesures isotopiques permettant des mesures à faible concentration, la principale question est celle du fractionnement isotopique potentiel entre l'eau et l'espèce bio-indicatrice considérée. « Est-il judicieux d'utiliser un bioindicateur pour approcher la signature isotopique du Hg dans l'eau ? » ou « Peut-on observer un fractionnement isotopique *in-vivo* ? ».

En terme de MDF, étant sensible à de nombreuses réactions biotiques et abiotiques, il est très probable d'en observer *in-vivo*. De nombreuses études ont détecté sa présence le long de différentes chaînes trophiques aquatiques (Perrot et al., 2010; Senn et al., 2010) mais aussi entre le prédateur et sa proie (Laffont et al., 2009). Ces observations dans la nature n'ont pas été confirmées par l'étude récente de Kwon et al. en laboratoire montrant l'absence de MDF entre le muscle/foie d'un poisson (perchaude, *Perca flavescens*) et sa nourriture (flocons du commerce) (Kwon et al., 2012). Cette dernière étude a été cependant menée en laboratoire sur des poissons de faibles tailles (« turnover » probablement élevé) et ne reflète pas les conditions naturelles ni les activités métaboliques observées chez les mammifères.

Plusieurs hypothèses apparaissent pour expliquer le MDF observé dans la nature le long de chaînes trophiques, dû au fait du métabolisme interne de détoxification et de redistribution vers différents organes. En effet la déméthylation *in-vivo* du MMHg précédemment incorporé via la nourriture a été démontrée dans de nombreuses études (Eagles-Smith et al., 2009; Wagemann et al., 2000). Du fait de la forte sensibilité du MDF observée pour de nombreuses réactions abiotiques ou biotiques on peut s'attendre à ce que les processus métaboliques internes de transfert et transformation du mercure produisent du MDF. Ce phénomène est probablement à l'origine du MDF observé entre le muscle de poisson et les cheveux des populations étudiées par Laffont et al. (Laffont et al., 2009). Ce fractionnement isotopique *in-vivo* a particulièrement été étudié dans cette thèse dans les chapitres 4 et 6. Basée sur une analyse isotopique spécifique des différentes espèces du Hg présentes dans différents organes chez les phoques, notre étude apporte une preuve sérieuse de l'existence de MDF *in-vivo*.

Tout comme le MDF, il a été montré dans une étude de chaîne trophique d'un lac d'eau douce en Floride que les signatures en $\Delta^{199}\text{Hg}$ étaient corrélées au $\delta^{15}\text{N}$, suggérant une augmentation du MIF avec le niveau trophique (Das et al., 2009). Dans cette étude, les auteurs suggèrent que les poissons

situés en bas de la chaîne trophique sont plus aptes pour approcher la signature isotopique de l'eau. Au contraire, les espèces en haut de la chaîne trophique, bio-accumulent et bio-amplifient le MMHg ce qui peut entraîner du MIF via les réactions biochimiques ou métaboliques. Cette hypothèse a été cependant largement mise en doute par l'absence de MIF significatif ($>1\%$) observée dans les réactions biotiques ou abiotiques non photochimiques (Table 5) et dans d'autres études de chaînes trophiques naturelles (Laffont et al., 2009; Perrot et al., 2010). De plus, l'étude expérimentale de Kwon et al. (2012) montre l'absence de MIF lors du transfert trophique entre la nourriture et le poisson en aquarium (Kwon et al., 2012). Ces observations sont confirmées dans cette thèse où aucune observation de MIF associé à des processus *in-vivo* n'a été observée (Chapitre 4 et 6).

2.2.3.2. Observations d'un découplage entre habitat côtier et océanique

Il est fort probable que les observations de Das et al. (2009) ou de Jackson et al. (2008) soient l'effet de différentes sources de MMHg (Das et al., 2009; Jackson et al., 2008). En effet, plusieurs études ont montré de forts gradients isotopiques $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ entre les chaînes trophiques côtières/benthiques et pélagiques/océaniques. Gantner et al. (2009) ont étudié la chaîne trophique présente dans les lacs Arctiques (Gantner et al., 2009). Ils ont trouvé que le zooplancton pélagique qui accumule du MMHg provenant directement de la colonne d'eau avait une signature isotopique en $\Delta^{199}\text{Hg}$ positive allant jusqu'à 3.4% . Au contraire, les chironomids benthiques affichent des anomalies plus faibles allant uniquement jusqu'à 1.3% (Gantner et al., 2009). Cette différence a été attribuée par la plus forte proportion de Hg inorganique provenant des sédiments (dont le MIF est supposé plus faible) dans les organismes benthiques de bas de chaîne trophique. De la même façon, Senn et al. (2010) ont comparé le MIF d'espèces de poissons côtières ($\Delta^{201}\text{Hg}\approx 0.4\%$) et pélagiques ($\Delta^{201}\text{Hg}\approx 1.5\%$) du Golfe du Mexique (Senn et al., 2010). Dans ce cas, l'hypothèse avancée est que le MMHg océanique a probablement subi une photo-dégradation plus intense avant d'entrer dans la chaîne alimentaire. Dernier exemple, Day et al. (2012) ont observé récemment en Alaska un gradient entre des œufs d'oiseaux prélevés dans un système côtier ($\Delta^{201}\text{Hg}\approx 0.6\%$) et ceux prélevés dans un système océanique ($\Delta^{201}\text{Hg}\approx 0.8\%$) (Day et al., 2012). Bien que la différence soit faible, une origine géogénique de Hg apporté par le « Yukon River » est suspectée en regardant en parallèle les isotopes stables du carbone ($\delta^{13}\text{C}$). En effet, la signature en $\delta^{13}\text{C}$ atteint de -23.3% à -20.0% pour les colonies sous influence de la Yukon River contre -20.9% à -18.7% pour celles sous influence plutôt océanique. Le mélange entre du mercure d'origine continentale et océanique est supposé pour expliquer un gradient local de MIF, bien que la gamme de variation soit relativement faible (0.2%).

Les principaux résultats des études majeures portant sur l'utilisation des isotopes du Hg dans les échantillons biologiques sont détaillés dans la Table 6. Pour résumer, ces études montrent une forte variabilité locale des signatures isotopiques en Hg (MDF, MIF) avec le plus souvent un découplage entre les systèmes côtiers vs océaniques ou profonds vs eaux de surface. Ces observations sur le

terrain ($\delta^{13}\text{C}$ vs $\Delta^{201}\text{Hg}$, (Day et al., 2012)) associées à l'influence du DOC sur plusieurs réactions impliquant le Hg (Table 5, photoréduction/déméthylation) suggèrent un possible lien étroit entre le cycle du Hg et le cycle du carbone. D'autre part, les signatures isotopiques du Hg sont déterminées systématiquement sur la fraction totale du Hg et ne tiennent pas compte de la spéciation du Hg potentiellement variable dans les échantillons analysés (Partie 1.3.3). Cette étude bibliographique suggère que des observations plus résolutive doivent être mises en œuvre, notamment en mesurant les signatures isotopiques du Hg ($\delta^{202}\text{Hg}_{\text{MMHg}}$, $\Delta^{199}\text{Hg}_{\text{MMHg}}$) et du carbone ($\delta^{13}\text{C}_{\text{MMHg}}$) à l'échelle moléculaire, spécifiquement sur la molécule de MMHg (Chapitre 6, 7 et 8).

Chapitre 2. Les isotopes stables du mercure

Table 6 : Principales études sur les isotopes du Hg dans les échantillons biologiques par ordre de parution.

Etude	Région	Espèce/Tissu	Milieu de vie	Principaux résultats → Implications
(Bergquist and Blum, 2007)	Lac Michigan (USA)	Barbot (poisson)/Muscle	Eau douce	-Pente $\Delta^{199}\text{Hg}$ vs $\Delta^{199}\text{Hg}$ =1.28 proche de la pente de la photo-déméthylation (1.36) → Traçage du mécanisme à l'origine du MIF (photoréduction vs photodéméthylation) → Utilisation du MIF pour quantifier des flux de Hg
(Jackson et al., 2008)	Lacs Arctiques (Canada)	Truite/Muscle	Eau douce	-Différence de MIF entre le Hg inorganique et MMHg chez les poissons → MIF durant la méthylation microbienne
(Laffont et al., 2009)	Rivière Beni/Itenez (Bolivie)	Espèces diverses de poissons/Muscle	Eau douce	-Décalage de $\delta^{202}\text{Hg}$ =2.0±0.2‰ entre les poissons et les cheveux de leurs consommateurs → 1 niveau trophique → MDF≈2‰
(Gantner et al., 2009)	Lacs Arctiques (Canada)	Zooplancton, chironomids, Arctid char/Muscle	Eau douce	-MIF plus faible dans les chironomids benthiques comparé au zooplancton de la colonne d'eau → Gradient de MIF benthique/colonne d'eau
(Das et al., 2009)	Lac Jackson, Floride (USA)	Zooplancton et poisson	Eau douce	-MIF augmente avec le niveau trophique → MIF durant transfert trophique
(Senn et al., 2010)	Golfe du Mexique	Espèces diverses de poissons/Muscle	Eau de mer	-Les thons océaniques ont une signature isotopique significativement plus lourde ($\delta^{202}\text{Hg}$ =0.2-0.5‰ et $\Delta^{199}\text{Hg}$ ≈1.5‰) comparé aux poissons côtiers ($\delta^{202}\text{Hg}$ ≈0 à -1‰ et $\Delta^{199}\text{Hg}$ ≈0.4‰) → MIF≠ entre espèces côtières et océaniques → Différentes sources de MMHg
(Perrot et al., 2010)	Lac Baïkal (Russie)	Perche, Gardon/Muscle	Eau douce	- $\delta^{202}\text{Hg}$ augmente avec le niveau trophique mais pas $\Delta^{199}\text{Hg}$ → Utilisation du MIF pour traçage de source de Hg anthropogénique
(Point et al., 2011)	Différentes mers d'Alaska (USA)	Œufs de guillemots	Eau de mer	-Fort gradient latitudinal entre les œufs d'oiseaux récoltés au nord (Mer de Chukchi, $\Delta^{201}\text{Hg}$ =0.48±0.08‰) et ceux récoltés au sud de l'Alaska (Golfe d'Alaska, $\Delta^{201}\text{Hg}$ =0.92±0.12‰) → Influence de la couverture de glace sur la photo-déméthylation
(Laffont et al., 2011)	Bolivie	Cheveux	-	-Corrélation Hg inorganique et $\delta^{202}\text{Hg}$ chez les mineurs → Traçage de l'exposition en Hg inorganique des mineurs (or)
(Day et al., 2012)	Mer de Béring, Alaska (USA)	Œufs de guillemots	Eau de mer	-Fort gradient entre les œufs d'oiseaux prélevés dans un système côtier ($\Delta^{201}\text{Hg}$ ≈0.6‰) et ceux prélevés dans un système océanique ($\Delta^{201}\text{Hg}$ ≈0.8‰) → Influence des apports géogéniques des rivières sur la signature isotopique du Hg
(Kwon et al., 2012)	Aquarium	Perchaude/Muscle	Eau douce	-Pas de variation de MIF entre la nourriture et le muscle ou foie du poisson → Rejet de la thèse du fractionnement isotopique durant le transfert trophique → Utilisation des isotopes du Hg dans les poissons pour tracer les sources de Hg dans les écosystèmes aquatiques
(Blum et al., 2013a)	Gyre du Pacifique central/Nord	Espèces diverses de poissons /Muscle	Eau de mer	-Variation du MIF avec la profondeur de vie des espèces → Utilisation des isotopes du Hg pour comprendre les lieux de méthylation dans la colonne d'eau.
(Li et al., 2014)	Iles Féroé et Golfe du Mexique	Cheveux/Globicephala/espèces diverses de poissons	Eau de mer	-Décalage de $\delta^{202}\text{Hg}$ =1.75‰ entre les Globicephala et les cheveux de leurs consommateurs → Utilisation de la combinaison $\delta^{202}\text{Hg}$ vs $\Delta^{199}\text{Hg}$ pour tracer les sources alimentaires de MMHg

2.2.4. Cas de l'Arctique

Le nombre d'études portant sur les isotopes du Hg en Arctique est assez limité (Day et al., 2012; Gantner et al., 2009; Point et al., 2011; Sherman et al., 2010). Les signatures isotopiques observées ($\delta^{202}\text{Hg}$, $\Delta^{199}\text{Hg}$) dans les différentes matrices environnementales sont résumées dans les Figure 30a et 30b. Les données sont classées en trois catégories : les échantillons d'air/neige, les échantillons d'eau douce (sédiments, zooplancton, poissons) et les échantillons d'eau de mer (œufs d'oiseaux marins). Ces systèmes étant découplés, il est difficile d'établir une comparaison entre eux.

On observe cependant que pour le $\delta^{202}\text{Hg}$, les valeurs présentent une amplitude d'environ 3‰ dont la moyenne est $0.08 \pm 0.75\text{‰}$ (SD, n=240). Pour $\Delta^{199}\text{Hg}$, bien que le (+)MIE soit le principal mécanisme à l'origine de MIF dans les échantillons, le (-)MIE a été observé dans certaines conditions de photoréduction aqueuse en présence de composés soufrés (Zheng and Hintelmann, 2010a) mais aussi lors de la photoréduction dans la neige de surface Arctique (Sherman et al., 2010). Les échantillons de neige de surface étaient appauvris en isotopes impairs, avec $\Delta^{199}\text{Hg}$ allant jusqu'à -5.08‰, alors que le Hg^0 gazeux collectés dans une chambre à flux montrait du Hg bien moins appauvri ($\Delta^{199}\text{Hg}$ jusqu'à -1.87‰). Le mécanisme à l'origine de ce MIF n'est pas bien défini mais la pente de 1.07 observée entre les produits et les réactifs de la réaction plaide bien pour le MIE photochimique. Il est probable que lors des périodes d'AMDEs (printemps), ce pool de Hg avec une signature MIF extrême rejoint le compartiment aquatique par les eaux de fontes (20 t.an^{-1} , (Fisher et al., 2012)) et modifie fortement sa signature isotopique. On observe cependant des valeurs quasi exclusivement positives dans les écosystèmes aquatiques, cohérent avec la présence de (+)MIE lors de réaction de photoréduction/photodéméthylation. Les anomalies $\Delta^{199}\text{Hg}$ retrouvées dans les écosystèmes marins (œufs d'oiseaux) sont relativement faibles ($\Delta^{199}\text{Hg}=0.96 \pm 0.28\text{‰}$ (SD, n=88)) comparées à celle obtenues dans les environnements marins du Pacifique central ($\Delta^{199}\text{Hg}$ de 1.5‰ (profond) à 5.3‰ (surface), (Blum et al., 2013b)). A l'heure actuelle, le manque de données dans les différents compartiments (sédiments, air, eau) ne permet pas d'expliquer complètement ces différences. Cependant, l'hypothèse la plus probable implique fortement la présence de couverture de glace en Arctique limitant la pénétration des rayons lumineux dans le compartiment aquatique à l'origine des réactions de photoréduction et photodéméthylation (Chapitre 4 et 5).

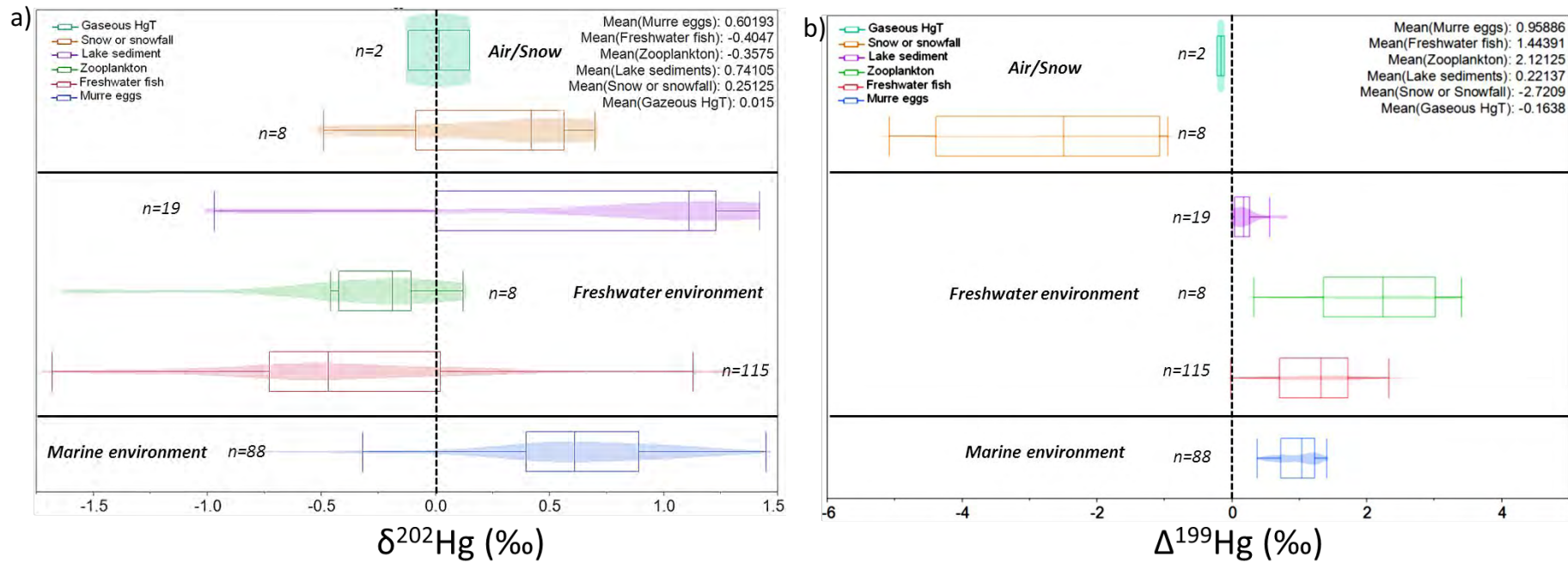


Figure 30 : Diagrammes en boîte des valeurs de a) MDF et b) MIF observés dans différents échantillons naturels de l'Arctique, compilées depuis (Day et al., 2012; Gantner et al., 2009; Point et al., 2011; Sherman et al., 2010)

2.2.5. Conclusions sur les isotopes du Hg et contribution de la thèse

La grande variabilité du fractionnement isotopique du Hg (MDF, MIF) observé dans la nature a rapidement suscité la curiosité de nombreux chercheurs du monde entier pour essayer de comprendre sa provenance mais aussi l'utilisation qui pouvait en être faite (traçage sources, mécanismes). Les études n'ont cessé d'augmenter depuis 2000. L'amélioration progressive des techniques analytiques a permis d'approcher les signatures isotopiques de nombreuses matrices. Cependant le manque de données dans les environnements peu concentrés comme les eaux naturelles, l'atmosphère ou le baseline des chaînes trophiques ne permet pas une caractérisation globale des écosystèmes. En 2011, Hintelmann et Wang ont résumé l'état des connaissances actuelles sur le fractionnement isotopique du Hg dans un schéma (Figure 31). Ce schéma complexe, ponctué de nombreuses inconnues, met en garde sur la sur-interprétation de données obtenues via des espèces bio-indicatrices ou autres proxys de compartiments (sédiments...). En effet, les signatures isotopiques des sources peuvent être altérées par de nombreux processus géochimiques intermédiaires dont les plus importants ont été décrits dans ce chapitre.

Nous avons gardé cette idée en tête tout le long de la thèse et une attention toute particulière a été portée à ne pas sur-interpréter les signatures isotopiques du Hg observées chez les bioindicateurs étudiés. Afin d'améliorer la résolution de nos observations isotopiques nous avons développé une méthode analytique précise dite de « compound specific isotope analysis » (CSIA) pour des échantillons biologiques. En effet, la mesure isotopique à l'échelle moléculaire présente un avantage certain lorsque l'on considère les systèmes où la spéciation et la transformation d'espèces du Hg se produit (exemple : foies, reins, cerveau). Par cette approche, nous pouvons étudier pour la première fois le fractionnement isotopique associé aux réactions de déméthylation dans le foie chez les mammifères aquatiques (Chapitre 6). Enfin, cette thèse explore de façon complémentaire et totalement novatrice l'analyse des isotopes stables du carbone sur la même molécule de MMHg (Chapitre 8).

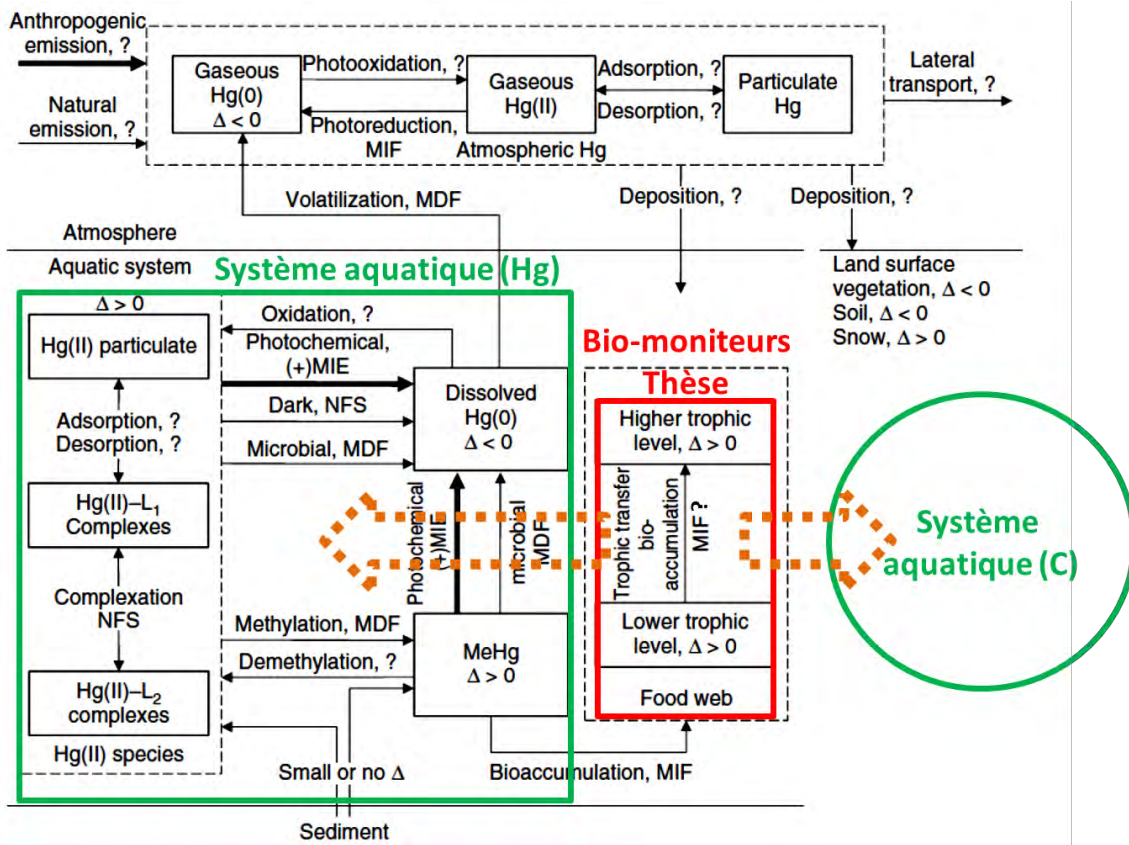


Figure 31 : Diagramme schématique de la spéciation du Hg accompagnée par son cycle isotopique. Les flèches en gras représentent les processus dominants. Les fractionnements isotopiques inconnus pouvant se produire sont indiqués par un « ? ». Modifié de (Liu et al., 2011) (Chapitre Holger Hintelmann et Wang Zheng)

Chapitre 3.

Présentation de l'étude et des bioindicateurs

Chapitre 3. Présentation de l'étude et des bioindicateurs

3.1. Description de la zone d'étude/échantillonnage

Les échantillons de cette thèse ont été obtenus par le biais du projet d'archivage « Alaska Marine Mammal Tissue Archival Project » (AMMTAP) mené par la « National Biomonitoring Specimen Bank » (NBSB) au « National Institute of Standards and Technology » (NIST, Charleston, SC). Ce projet a pour but d'échantillonner des tissus de mammifères marins d'Alaska et de les conserver dans les meilleures conditions possibles (Azote liquide) pour permettre des analyses rétrospectives de contaminants et mettre en évidence l'effet de la régulation de polluants. Un protocole strict de prélèvement, de cryo-homogénéisation et de stockage cryogénique est respecté et est détaillé dans (Becker et al., 1990). Au total nous disposons de 53 échantillons de foies de phoques annelés, 53 foies de baleines belugas et 15 foies d'ours polaires. Ces échantillons s'ajoutent aux 43 échantillons d'œufs de guillemots déjà analysés (et publié) par notre groupe (Point et al., 2011). Leur répartition spatiale est représentée sur la Figure 32 et en Annexes pour les échantillons d'ours polaires (Figure S1). Un résumé de leur nombre par région et par espèce est aussi présenté en Table 7.

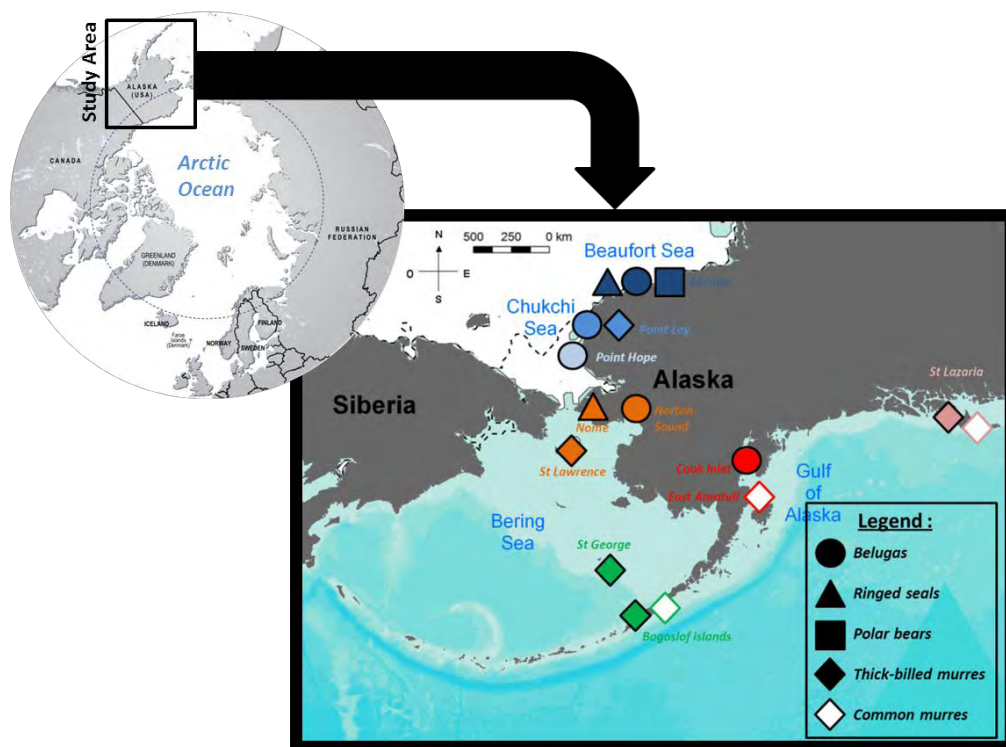


Figure 32 : Carte représentant les différentes régions d'échantillonnage des mammifères (phoques annelés, belugas, ours polaires, cette thèse) ou œufs d'oiseaux marins (guillemots, (Point et al., 2011)) étudiés dans ce travail.

Table 7 : Résumé des échantillons disponibles au GET.

Espèces	Régions	n	Périodes	Références
Phoques annelés (<i>Pusa hispida</i>)	Barrow	39	1988-2002	Analysés durant la thèse
	Nome	14	1989-1997	
Baleines belugas (<i>Delphinapterus leucas</i>)	Barrow	4	1997-1999	
	Point Lay	26	1990-1999	
	Point Hope	4	1989	
	Norton Sound	4	2000	
	Cook Inlet	15	1992-1996	
Ours polaires (<i>Ursus maritimus</i>)	Barrow	10	1996-2000	
	Gambell	1	2002	
	Little Diomedé	1	2001	
	Point Lay	1	2001	
	Prudhoe Bay	1	1999	
	Savoonga	1	1999	
Guillemots (<i>Uria lomvia</i> , <i>Uria aalge</i>)	Cape Lisburne (Point Lay)	5	2002	Préalablement analysés et publiés (Point et al., 2011)
	St Lawrence	2	2002	
	St George	3	2002	
	Bogoslov Island	9	2000	
	East Amatuli	5	1999	
	St Lazaria	19	1999-2002	

3.2. Description des bioindicateurs

3.2.1. Définition d'un bioindicateur

Un bioindicateur peut être défini comme un organisme qui répond de façon prédictible à une contamination de telle sorte qu'elle soit observable et quantifiable dans le temps (Zillioux and Newman, 2003). Les espèces composant la faune sauvage sont des bons bioindicateurs car en plus de refléter la présence ils renseignent sur la bio-accessibilité du contaminant (Harris et al., 2010). Ils intègrent au fil du temps et de l'espace les sources locales ou globales de contamination et peuvent servir de proxy pour évaluer une toxicité pour la santé humaine (Eisler, 2010). Ils reflètent l'exposition biologique à un environnement physique ou chimique (Farrington, 1991). Le choix d'un bioindicateur est basé sur une combinaison de facteurs ou de caractéristiques (Harris et al., 2010):

- **Connaissance de l'habitat, des ressources alimentaires et des stratégies de prédation du bioindicateur**
- Capacité à concentrer et accumuler le contaminant concerné
- Commun dans l'environnement
- Répandu géographiquement
- Sensible aux changements physiques, chimiques ou biologiques
- Facile à échantillonner et analyser
- De taille adéquate pour pouvoir le re-échantillonner si nécessaire
- Présence dans des régions impactées et de référence
- Corrélation avec les niveaux de contamination dans l'écosystème

Nous nous sommes aperçus au cours de cette thèse qu'en réalité aucune des espèces disponibles dans la specimen bank du NIST ne remplit l'ensemble de ces critères et que le premier critère qui concerne la dynamique écologique est souvent le plus délicat à caractériser. Un couplage avec les études de suivi satellitaire des bio-moniteurs par pose de balises GPS permet de mieux connaître leurs mouvements globaux et de caractériser leur habitat. Les trois espèces de prédateurs terminaux étudiés, le phoque annelé (*Pusa hispida*), la baleine beluga (*Delphinapterus leucas*) et l'ours polaire (*Ursus maritimus*) présentent chacun leurs propres avantages et inconvénients.

3.2.2. Etude de biomonitoring-Hg chez le phoque annelé (*Phoca hispida*)

Les caractéristiques globales (comportement, distribution, proies/prédateurs...) du phoque annelé sont détaillées dans la Table S2 en Annexes. Leur distribution circumpolaire et le fait qu'il ne soit pas classé comme espèce « en danger » ont justifié son utilisation comme espèces sentinelles utilisées pour évaluer les niveaux de contamination en Hg. Ces travaux sont résumés en Table 8 (Voir Annexes pour détails, Table S3 (Becker et al., 1995; Dehn et al., 2006; Medvedev et al., 1997; Riget et al., 2005; Wagemann et al., 1996)).

Table 8 : Compilation des principales études portant sur les concentrations en Hg dans le foie de phoques annelés. Détails disponibles en Annexes (Table S2).

Régions	n	Date de prélèvement	Moyenne [HgT] µg.g ⁻¹	Incertitude µg.g ⁻¹	Références
Alaska	90	1988-1997	2.56	1.67	(Becker et al., 1995; Dehn et al., 2006; Riget et al., 2005)
Ouest Arctique Canadien	21 0	1987-2001	23.89	6.04	(Dehn et al., 2006; Riget et al., 2005; Wagemann et al., 1996)
Est Arctique Canadien	18 0	1992-2000	14.20	8.31	(Riget et al., 2005; Wagemann et al., 1996)
Groenland	21 7	1978-2000	4.60	5.07	(Dietz et al., 1996; Riget et al., 2005)
Mer Blanche Russie	54	2001	2.83	1.22	(Medvedev et al., 1997; Riget et al., 2005)
Svalbard	17	1996	0.92	0.39	(Riget et al., 2005)

Les phoques annelés se déplacent généralement vers le sud quand la glace s'étend en hiver et vers le nord quand la glace se retire au printemps (Kelly et al., 2010b). Les principales études satellites (résumées en Annexes, Figure S2) montrent des déplacements importants mais reproduits chaque année (plusieurs milliers de kms annuels, (Crawford et al., 2012; Harwood et al., 2012)) entre les mers de Béring et de Chukchi (individus échantillonnés à Nome) et celles de Chukchi et de Beaufort (individus échantillonnés à Barrow). Cette espèce privilégie plutôt un habitat peu profond (<100m) sur le plateau continental (Crawford et al., 2012; Harwood et al., 2012). Les études télémétriques suggèrent que les jeunes individus (<5 ans) intègrent un habitat plus large que les adultes qui restent plus proches des

côtes (Crawford et al., 2012). Ces derniers ont un comportement plus territorial, notamment pendant la période de reproduction avec un haut taux de fidélité interannuel de retour sur leur zone géographique de reproduction (Kelly et al., 2010a). Cette fidélité interannuelle est un atout considérable pour ce bioindicateur et a orienté l'utilisation récurrente de ce bio-moniteur pour détecter des tendances temporelles de différents contaminants (Chapitre 4, (Aubail et al., 2010; Bossi et al., 2005; Gaden et al., 2009; Riget et al., 2012; Riget et al., 2006; Vorkamp et al., 2011; Wagemann et al., 1996)).

3.2.3. Etude de biomonitoring-Hg chez la baleine beluga (*Delphinapterus leucas*)

La baleine beluga est considérée comme un excellent bioindicateur parce qu'elle présente une distribution géographique très marquée et qu'elle est commune en Arctique (description générale en Annexes, Table S4). Elle est particulièrement sensible à l'activité humaine par son agrégation dans les estuaires des rivières. Ainsi, de grandes quantités de substances chimiques comme le DDT ou des métaux lourds (Pb, Hg, Cd) ont été mesurés chez des individus vivant dans la rivière Saint Laurent au Canada (Béland, 1996). Pour le Hg, la Table 9 résume les principales études portant sur les concentrations en Hg dans le foie (voir Annexes pour plus de détails, Table S5 (Becker et al., 2000; Becker et al., 1995; Dehn et al., 2006; Dietz et al., 1996; Hansen et al., 1990; Lockhart et al., 2005; Loseto et al., 2008; Wagemann et al., 1996; Woshner et al., 2001)).

Table 9 : Compilation des principales études portant sur les concentrations en Hg dans les foies de baleines beluga. Détails disponibles en Annexes.

Régions	n	Date de prélèvement	Moyenne [HgT] ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Incertitude ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Références
Alaska	93	1983-1997	15.59	11.82	(Becker et al., 2000; Becker et al., 1995; Dehn et al., 2006; Woshner et al., 2001)
Ouest Arctique Canadien	268	1981-2005	21.82	11.91	(Lockhart et al., 2005; Loseto et al., 2008; Wagemann et al., 1996)
Est Arctique Canadien	480	1985	9.47	1.51	(Lockhart et al., 2005; Wagemann et al., 1996)
Groenland	28	1978-2000	1.59	1.12	(Dietz et al., 1996; Hansen et al., 1990)

Contrairement aux phoques, les belugas sont des animaux sociaux qui migrent, qui chassent et interagissent en groupes. Ils vivent en groupes de plusieurs dizaines d'individus et plusieurs groupes forment ce que l'on appelle un stock (typiquement plusieurs milliers d'individus). La notion de stock est utilisée pour définir les différents groupes d'individus effectuant les mêmes migrations saisonnières, synchronisées par le moment de la fonte de la banquise. En Alaska, cinq stocks ont été identifiés. Leur détermination a été initialement basée sur les différentes zones d'agrégations estivales (Frost and Lowry, 1990) puis confirmée par des études génétiques (O'Corry- Crowe et al., 1997). En effet elles ont montré des haplotypes différents chez les cinq stocks présents en Alaska. (Figure 33).

Ainsi, du Nord au sud on peut distinguer le stock du « Eastern Beaufort Sea » (EBS), « Eastern Chukchi Sea » (ECS), « Norton Sound » (NS), « Bristol Bay » (BB) and « Cook Inlet » (CI). Ces stocks sont bien définis, ce qui est un avantage pour étudier la signature isotopique du Hg associée à leurs habitats spécifiques.

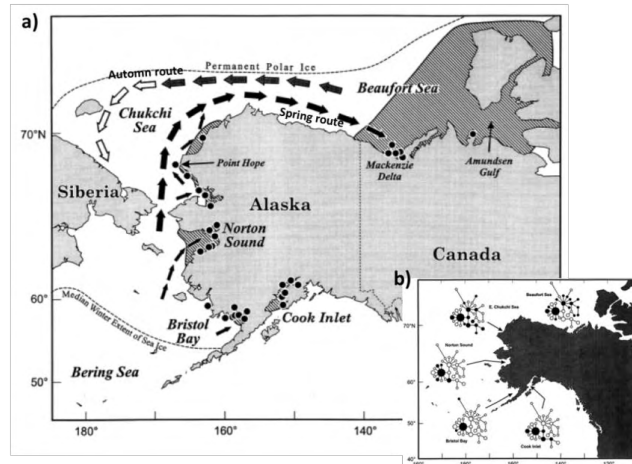


Figure 33 : a) Carte présentant les cinq zones d'agrégation estivale (hachuré) des belugas d'Alaska. b) Diversité des haplotypes des cinq stocks de belugas présents en Alaska. D'après (O'Corry-Crowe et al., 1997)

Quelques études satellites se sont intéressées aux mouvements saisonniers des belugas (résumées en Annexes, Figure S3). Une étude de Suydam et al. (2001) a permis de connaître les déplacements estivaux des belugas échantillonnés à Point Lay (ECS stock). La carte des déplacements est présentée en Annexes sur la Figure S2. Les belugas du ECS se déplacent sur de longues distances (<2000 km, (Frost and Lowry, 1990; Suydam et al., 2001)). Contrairement aux phoques annelés d'Alaska les belugas ne se cantonnent pas aux zones de plateau peu profond des mers de Chukchi/Beaufort/Béring. Les observations estivales effectuées sur des belugas de l'ECS suivis par satellites ont montrés des plongées en profondeurs au-delà de 860m dans les eaux profondes (>3000m) de l'océan Arctique central (jusqu'à 700km de Barrow) (Suydam et al., 2001). Ces données de télémétries contrastent avec les travaux plus anciens qui considèrent uniquement un habitat côtier. Une deuxième étude de Hobbs et al. (2005) portant sur les belugas du CI stock a permis de montrer leur haut degré de sédentarisation dans cette région (Hobbs et al., 2005). Pour ce stock les déplacements annuels sont restreints résultant en des aires de distribution (zone ou 95% des belugas se trouvent) très limitées allant de 982 km² en été jusqu'à 5000 km² en hiver. Cet isolement confirme le fait que leur population soit la plus distincte génétiquement des autres populations d'Alaska (O'Corry-Crowe et al., 1997).

3.2.4. Etude de biomonitoring-Hg chez l'ours polaire (*Ursus Maritimus*)

Situé au plus haut de la chaîne alimentaire, l'ours polaire (*Ursus Maritimus*) est l'une des espèces les plus emblématiques de l'écosystème Arctique (description disponible en Annexes, Table S6). La préoccupation de leur conservation est forte et ils sont classés comme espèce « à risque », « en danger » et « en décroissance de population » par le « Marine Mammal Protection Act ». Bien que protégée, quelques exceptions sont accordées lors de chasses de subsistance des Inuits permettant aux scientifiques de pouvoir récupérer des tissus et organes pour connaître leur niveau de contamination en Hg (résumé en Table 10 et Annexes pour détails, Table S7 (Dehn et al., 2006; Dietz et al., 2000; Dietz et al., 1996; Norheim et al., 1992; Rush et al., 2008)).

Table 10 : Compilation des principales études portant sur les concentrations en Hg dans les foies d'ours polaires. Détails disponibles en Annexes.

Régions	n	Date de prélèvement	Moyenne [HgT] ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Incertitude ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Références
Alaska	32	1983-1999	12.19	2.58	(Dehn et al., 2006; Rush et al., 2008)
Ouest Arctique Canadien	11	2002	62.49	11.37	(Rush et al., 2008)
Est Arctique Canadien	23	2002	28.37	15.75	(Rush et al., 2008)
Groenland	128	1983-2000	11.09	6.13	(Dietz et al., 2000; Dietz et al., 1996; Rush et al., 2008)
Norvège	22	1978-1990	2.25	0.49	(Norheim et al., 1992)

Malgré cette distribution globale, on peut distinguer 19 sous-populations d'ours polaires reproduisant des migrations saisonnières mais non génétiquement différentes (Paetkau et al., 1999). Avec les difficultés que l'on peut imaginer, les études avec pose de balises satellites sont peu nombreuses. Une étude de Garner et al. a étudié le déplacement des ours polaires dans les mers de Béring et Chukchi (Annexes, Figure S4, (Garner et al., 1990)). La première observation est la confirmation de la variation saisonnière de l'habitat entre l'été où l'ours vit dans la mer de Chukchi et l'hiver où il descend jusqu'au nord de la mer de Béring. Une autre observation est la zone de vie plus large en période estivale, cependant le nombre de mesures différents entre les deux périodes. Globalement, le déplacement des ours polaires est synchronisé aux déplacements de leur proie principale, les phoques annelés.

3.2.5. Possibles limites à l'étude des bioindicateurs

3.2.5.1. Impact du changement climatique sur l'écologie et influence sur le cycle du Hg

Un changement dans l'environnement de vie du bioindicateur (sources de nourritures, nouvelles prédatons etc...) peut engendrer un changement de comportement et donc la source de Hg à

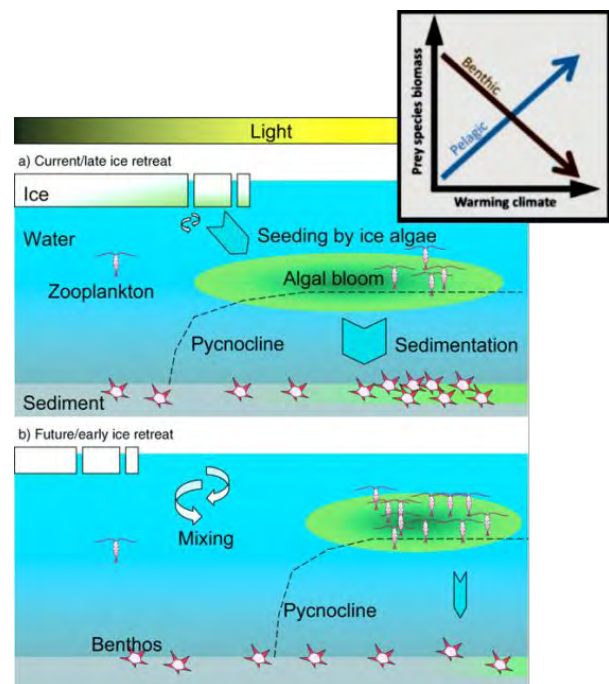
laquelle un prédateur est exposé. Particulièrement impacté par le changement climatique, l'Arctique subit des modifications écologiques importantes. Leurs potentielles influences sur les processus du Hg sont résumées dans la Table 11.

Table 11 : Résumé des impacts écologiques possibles engendrés par un changement climatique. Modifié de (AMAP, 2011).

Niveau d'impact	Impact sur l'écosystème marin Arctique	Influence sur les processus du Hg
Source	Changement dans le carbone/énergie/productivité	« Uptake » du Hg dans les niveaux inférieurs des chaînes trophiques
Espèces	Taux de croissance: bio-dilution, accumulation	Taux de bioaccumulation
Chaîne trophique	Taille de la chaîne trophique (introduction/disparition d'espèces)	Taux de biomagnification

Bluhm et Gradinger en 2008 ont proposé un scénario de distribution régionale de la biomasse en contexte de changement climatique (Figure 34, (Bluhm and Gradinger, 2008)). Selon eux, un retrait précoce de la glace permet un mélange plus intense des masses d'eau par le vent et une formation plus tardive de la pycnocline (zone de changement brusque de la densité). Le « bloom » phytoplanctonique serait lui aussi retardé et alors consommé massivement par le zooplancton. Dans des conditions « normales » de retrait de la glace, le phytoplancton tombe en grande quantité au fond (plateau) et alimente la biomasse benthique. Ainsi un retrait anticipé de la couverture de glace favoriserait la production de biomasse pélagique par rapport à la biomasse benthique.

Figure 34 : Représentation schématique du cycle saisonnier de la production marine a) lors d'un retrait tardif et b) lors d'un retrait précoce de la couverture de glace. D'après (Bluhm and Gradinger, 2008).



De nombreuses espèces opportunistes, comme les phoques annelés par exemple, sont susceptibles d'être affecté par ce changement de dynamique de la production primaire. Ainsi, il a été montré que les phoques avaient légèrement changé leur alimentation entre les années 1960-1970 et 1998-2010 (Figure 35, (Crawford, 2013)) augmentant leur consommation de poissons (espèces à dominantes pélagiques) et diminuant celle d'invertébrés (espèces à dominantes benthiques). Les dynamiques d'accumulation du Hg dans ces deux environnements sont très différentes avec notamment un rôle très important des caractéristiques des sédiments dans la détermination de l'«uptake» du MMHg chez les invertébrés (Mason, 2001).

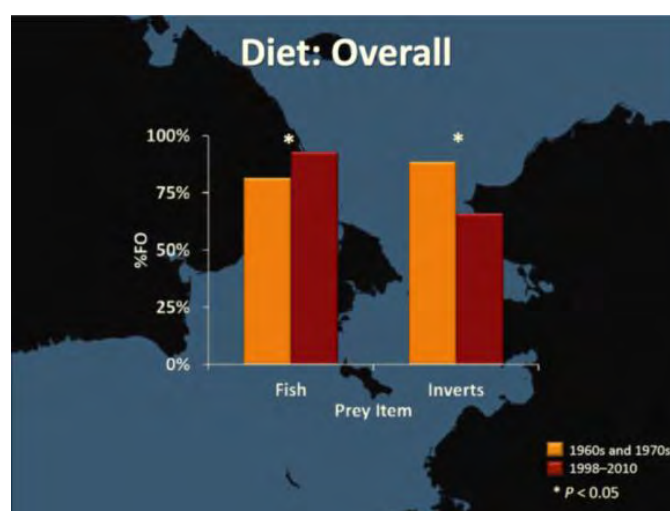


Figure 35 : Fréquence de rencontre de poissons et d'invertébrés dans les estomacs de phoques annelés entre les années 1960s-1970s et 1998-2010. D'après (Crawford, 2013).

Un autre effet suspecté concerne la taille de la chaîne trophique, avec la possible introduction ou disparition d'espèces due au changement climatique (AMAP, 2011). Avec des facteurs de biomagnification de 10^4 entre l'eau et le phytoplancton, puis entre 4-6 à chaque niveau trophique (voir précédemment), un changement dans la structure de la chaîne trophique peut engendrer des fortes modifications de concentration en MMHg en bout de chaîne chez les prédateurs.

3.2.5.2. Exemple d'une ourse téméraire

Une étude de Durner et al. (1995) a montré un cas exceptionnel de déplacement à longue distance d'une ourse capturée sur la côte Alaska de la mer de Beaufort en mai 1992 (Durner and Amstrup, 1995). Son parcours est représenté sur la Figure 36. Elle a rejoint le Groenland depuis l'Alaska en parcourant une distance de 5256 km. Ce changement d'habitat et de sous-population n'avait jamais été observé jusqu'alors. De plus, il est montré qu'elle a mis bas dans chacune des régions démontrant le potentiel d'échange génétique entre les différentes populations.

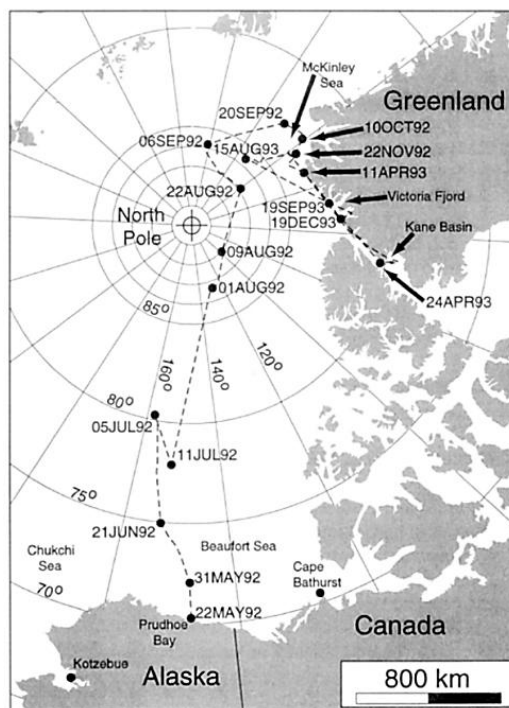


Figure 36 : Voyage d'une ourse collectée à Prudhoe Bay le 22 May 1992. D'après (Durner and Amstrup, 1995)

Cet exemple montre clairement une limite de l'utilisation des bioindicateurs car il est impossible de maîtriser totalement la variabilité individuelle naturelle. Mis à part mettre une balise sur chaque individu durant toute sa vie, il est difficile de connaître avec exactitude le passé d'un individu échantillonné à un endroit donné. Il existe donc dans un même stock/groupe d'individu, une variabilité naturelle qu'il sera forcément difficile d'expliquer.

3.3. Analyses effectuées sur les bioindicateurs

Le protocole de prélèvement des échantillons suivi par le NIST et le NOAA pour l'AMMTAP est résumé par Becker et al. (1991). Plusieurs paramètres comme la date, le lieu (latitude/longitude), le sexe, la longueur et le poids de l'individu sont déterminés sur-site. Pour certains échantillons, l'âge est déterminé ultérieurement par des techniques de comptage des cercles de croissance présents au niveau des ongles ou des dents. Toutes les analyses effectuées par la suite lors de la thèse sont résumées dans « Matériels and Méthodes » de chaque chapitre. Ayant une place centrale dans cette thèse, la détermination de la signature isotopique du Hg est cependant résumée ci-dessous en français.

3.3.1. Techniques analytiques classiques (BSIA)

Le « bulk stable isotope analysis » (BSIA) consiste en la mesure simultanée des isotopes d'un élément sans séparation préalable. Pour le Hg, cette analyse considère donc la fraction totale HgT dans le foie pouvant contenir initialement les formes résumées dans la Figure 37.

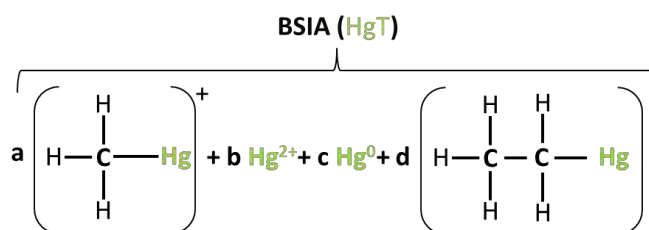


Figure 37 : Différentes espèces de Hg potentiellement analysées lors d'analyses en BSIA

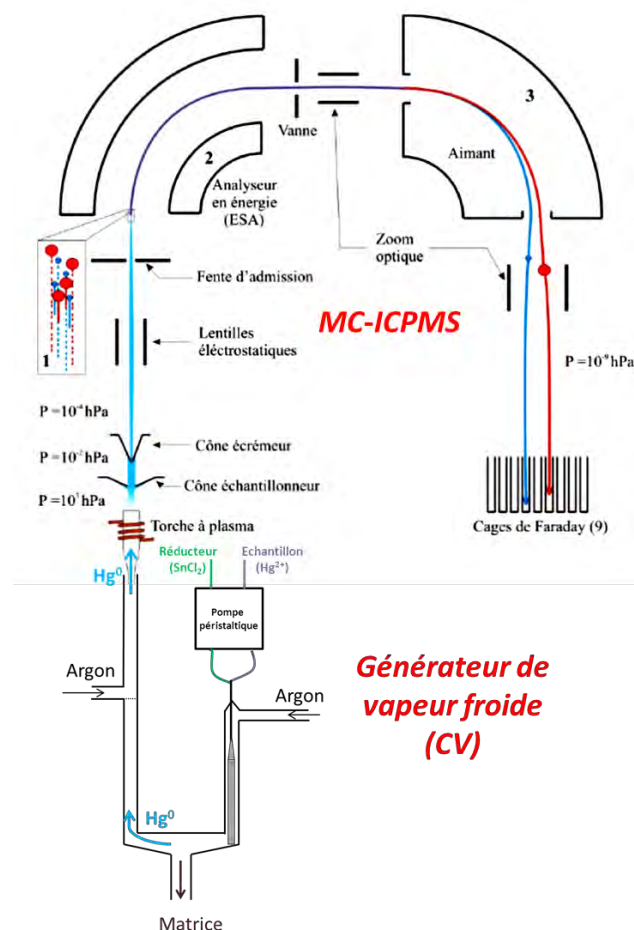
Préparation des échantillons

Entre 0,05 et 0,5 g d'échantillon frais sont pesés dans un tube en Pyrex pour digestion micro-onde de 25 mL. Cinq millilitres d'acide nitrique bi-distillés (15 mol.L^{-1}) sont ensuite ajoutés et le tube est fermé avec des bouchons en Téflon. La digestion de l'échantillon s'effectue en système fermé pendant 5 minutes à 180°C à pression maximale de 28 bars (micro-onde CEM Discover). La solution est ensuite diluée dans une matrice eau régale inverse (3 HNO_3 : 1 HCl , 20 vol.%) pour l'analyse. La concentration finale atteint entre 0,5 et 2 ng.g^{-1} . Par cette méthode, le rendement moyen obtenu sur les échantillons est de $98 \pm 7\%$ (SE) contrôlé par le signal ^{202}Hg sur MC-ICPMS (en comparaison de la solution standard NIST3133). Plusieurs tests ont été effectués avec et sans ajout de BrCl ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ dans 10 mol.L^{-1} de HCl) et aucune différence n'a été détectée confirmant l'oxydation totale de Hg et absence de liaisons avec les graisses et autres ligands organiques. Une digestion complète (>85% de rendement) est indispensable afin d'écartier tout fractionnement lors de la préparation de l'échantillon. Ce protocole a été appliqué sur tous les échantillons de bio-monitoring et il permet de déterminer la composition isotopique sur la fraction totale du Hg sans distinction (ou BSIA).

Analyse de la composition isotopique en Hg

La technique analytique classique des isotopes stables du Hg s'effectue au moyen d'un spectromètre de masse à multi collection (MC-ICPMS). Brièvement, l'analyse des échantillons par MC-ICP-MS peut être divisée en trois étapes : ionisation, séparation en masse, détection. L'ionisation se fait de façon thermique dans une torche à plasma (entre 6000 et 10000°C). L'Electrostatic Analyser (ou ESA) provoque une première déviation des ions en fonction de leur énergie cinétique. Les ions sont déviés à nouveau de 90° dans le secteur magnétique (aimant) en fonction de leur rapport masse/charge, induisant un chemin variable des isotopes selon leur masse, en relation avec la force de Lorenz qui s'applique sur eux. A la sortie de l'aimant, le faisceau ionique est scindé en autant de sous-faisceaux qu'il y a d'isotopes, chacun se déplaçant selon une trajectoire propre. Une fois séparés, les isotopes sont recueillis dans des cages de Faraday (huit mobiles de part et d'autre d'une cage centrale fixe) générant un signal électrique amplifié permettant la détermination de leur abondance relative. Afin de limiter les interférences isobariques, le Hg est introduit séparé de la matrice par un système de vapeur froide (cold vapor, CV). Les échantillons pré-minéralisés/digérés sont mélangés en-ligne avec SnCl₂ (5% m:m dans 10% m:m HCl) menant à la réduction de Hg²⁺ en Hg⁰ et poussés ensuite vers la torche à plasma par un flux d'argon. Le couplage entre le générateur de vapeur froide et le MC-ICPMS est présenté sur la Figure 38.

Figure 38 : Schéma descriptif du couplage CV-MC-ICPMS utilisé lors de l'analyse de la composition isotopique du Hg en solution au GET. Adapté de (Zambardi, 2011)



Cette technique a été utilisée pour la première fois sur le Hg par Lauretta et al. (2001), sur des chondrites (Lauretta et al., 2001). Cette méthode obtenait des précisions de l'ordre de 0,2 à 0,5‰ (Lauretta et al., 2001). Aujourd'hui la précision atteint typiquement 0,1‰ sur $\delta^{202}\text{Hg}$ et sur $\Delta^{199}\text{Hg}$ (Bergquist and Blum, 2007). Cette configuration représente la méthode de référence employée pour la mesure des isotopes du Hg. Le NIST SRM 3133 a été par la suite proposé par Blum et Bergquist (2007) comme standard de référence à employer par la communauté scientifique travaillant sur les isotopes du Hg (Blum and Bergquist, 2007). Ainsi, les échantillons et ce standard sont analysés alternativement afin de corriger le biais de masse de la machine en appliquant la correction appelée « sample-standard bracketing ». La notation delta (δ) tient compte de ce standard et permet la comparaison des ratios isotopiques entre tous les laboratoires :

$$\delta_A = \left[\left(\frac{R_A}{R_{\text{Std}}} \right) - 1 \right] \times 1000 \quad (\text{‰})$$

Pour Hg:

$$\delta^{\text{xxx}}\text{Hg} = \left[\left(\frac{\left(\frac{\text{xxxHg}}{^{198}\text{Hg}} \right)_{\text{sample}}}{\left(\frac{\text{xxxHg}}{^{198}\text{Hg}} \right)_{\text{NIST 3133}}} \right) - 1 \right] \times 1000 \quad (\text{‰})$$

Un ou plusieurs standards externes sont également analysés pour chaque série de mesures (exemple : UM-Almadén, provenant du Hg liquide extrait de la mine de cinabre d'Almadén, Espagne) afin de valider la justesse des compositions isotopiques en Hg mesurées dans l'échantillon. En général, on choisit des géo-standards de référence (certifiés en concentration) dont la matrice est proche de l'échantillon étudié et dont les compositions isotopiques ont déjà été mesurées. Lors de cette thèse, nous avons analysé au cours de chaque session le standard de foies frais de baleine Pygmy sperm NIST-QC03LH03 dont la matrice est similaire à nos échantillons. Des valeurs consensus ont été déterminées et sont présentées dans le Chapitre 4. Un exercice d'inter-comparaison organisé par le NIST a été effectué sur l'échantillon frais de truites de lac NIST-SRM-1947. Nos mesures sont en accords avec les valeurs obtenues par des laboratoires divers confirmant la précision et la justesse des mesures réalisées au laboratoire du service ICP-MS de l'Observatoire Midi-Pyrénées.

En règle générale, le CV-MC-ICPMS peut seulement mesurer des échantillons dont la concentration est relativement haute ($>0,25 \text{ ng.g}^{-1}$). Les récents développements des techniques de séparation de matrice et de pré-concentration devront permettre l'analyse d'échantillons à faibles concentrations comme les eaux naturelles ou les précipitations atmosphériques par exemple (Chen et al., 2010; Chen et al., 2012).

3.3.2. Techniques analytiques nouvelles (CSIA)

Avec un niveau d'attention moléculaire, le « compound specific isotope analysis » ou CSIA est une analyse beaucoup plus résolutive. Elle consiste en une analyse de la composition isotopique des atomes contenus dans une molécule. Cette séparation peut se faire « on-line » (chromatographie gazeuse ou liquide) ou « off-line » (extraction physico-chimique, SEM). Dans cette thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés à développer une méthode d'analyse isotopique pour le Hg (Chapitre 7) et le carbone (Chapitre 8) à l'échelle moléculaire pour le composé MMHg (Figure 39). Bien que considérée comme une molécule biogène neurotoxique, l'étude de ce composé est au centre de la plupart des recherches actuelles sur le Hg afin de déterminer les conditions exactes de sa formation.

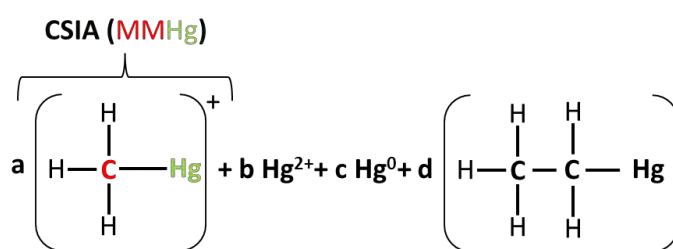


Figure 39 : Etude spécifique sur la molécule de MMHg lors d'analyse CSIA du Hg et du C.

Préparation des échantillons

Séparation physico-chimique du MMHg (SEM)

La séparation préalable du MMHg se fait par méthode d'extraction sélective ou SEM basée sur les travaux de Uthe et al. (1972) (Uthe et al., 1972) et fait l'objet d'une publication (Chapitre 7, (Masbou et al., 2013)). En salle blanche ISO 5 (Figure 40), Entre 0,25 et 1 g d'échantillon est pesé dans un tube à centrifuger de 50 mL (Falcon, VWR). Ensuite, 5 mL de bromure de sodium acide (30% m/m NaBr dans 4 mol.L⁻¹ H₂SO₄), 10 mL de sulfate de cuivre aqueux (2.5% m/m CuSO₄ anhydre) et 10 mL de toluène sont ajoutés dans l'ordre. L'étape d'extraction consiste en l'agitation à 420 rpm des tubes sur table d'agitation va et vient pendant 1 heure. Durant l'extraction, l'action combinée des réactifs extrait le MMHg de la matrice et le converti en MMHgBr qui passe rapidement en phase organique (toluène). Entre 3 et 6 mL de toluène est ensuite prélevé et vortexé pendant 1 min avec 4 mL d'une solution aqueuse de thiosulfate de sodium (0,005 mol.L⁻¹). Le MMHg ayant de plus fortes affinités avec les groupements soufrés, retourne en phase aqueuse.

Pour la Hg-CSIA sur MMHg, un aliquot de cette solution est dilué dans de l'eau régale inverse (3 HNO₃ : 1 HCl, 20 vol.%) et 1 à 3% vol. de BrCl (0,2 mol.L⁻¹ dans 10 mol.L⁻¹ de HCl) est ajouté 12h avant analyse. Pour la C-CSIA, la formation d'espèces volatiles est indispensable afin de les

introduire dans une chromatographie gazeuse (GC-IRMS). Les différents protocoles utilisés sont détaillés dans le Chapitre 8.



Figure 40 : Photographie prise lors de la SEM en salle blanche ISO 5 du laboratoire Géoscience Environnement Toulouse.

Analyse de la composition isotopique en Hg et C

Alors que l'analyse Hg-CSIA s'effectue de la même manière que pour le HgT-BSIA (voir Partie 2.1.1), l'analyse C-CSIA diffère par l'utilisation d'un couplage chromatographie gazeuse-IRMS (GC-IRMS). Le couplage est décrit sur la Figure 41 (Chapitre 8). Brièvement, les constituants volatils sont d'abord séparés par chromatographie en phase gazeuse (GC Trace Ultra Thermo Scientific). Poussés par un gaz vecteur (He), les composés présents sont séparés les uns des autres par différences de temps de rétention sur la colonne présentant différents groupements fonctionnels non polaires (Agilent DB-5 et Restek RTX-5). Chaque molécule est ensuite oxydée par une étape de combustion à 940°C (GC-Isolink, Thermo Scientific) située en sortie de colonne GC. Il en résulte la formation majoritaire de CO₂ et d'H₂O, chaque atome de carbone présent dans la molécule étant susceptible de produire une molécule de CO₂. Le CO₂ produit dispose d'un rapport isotopique ¹³C/¹²C identique à la molécule de départ. Le CO₂ produit est alors introduit dans la source à impact électronique du spectromètre de masse afin d'ioniser les molécules en ion ¹²C¹⁶O₂⁺ et ¹³C¹⁶O₂⁺ selon le rapport isotopique initial de la molécule. Tout comme le Hg, la notation δ est utilisée permettant la comparaison des valeurs entre tous les laboratoires utilisant le standard de référence de Pee Dee Belemnite (PDB) :

$$\delta^{13}C (\text{‰}) = \left(\frac{\left(\frac{^{13}C}{^{12}C} \right)_{\text{sample}}}{\left(\frac{^{13}C}{^{12}C} \right)_{\text{PDB}}} - 1 \right) \times 1000$$

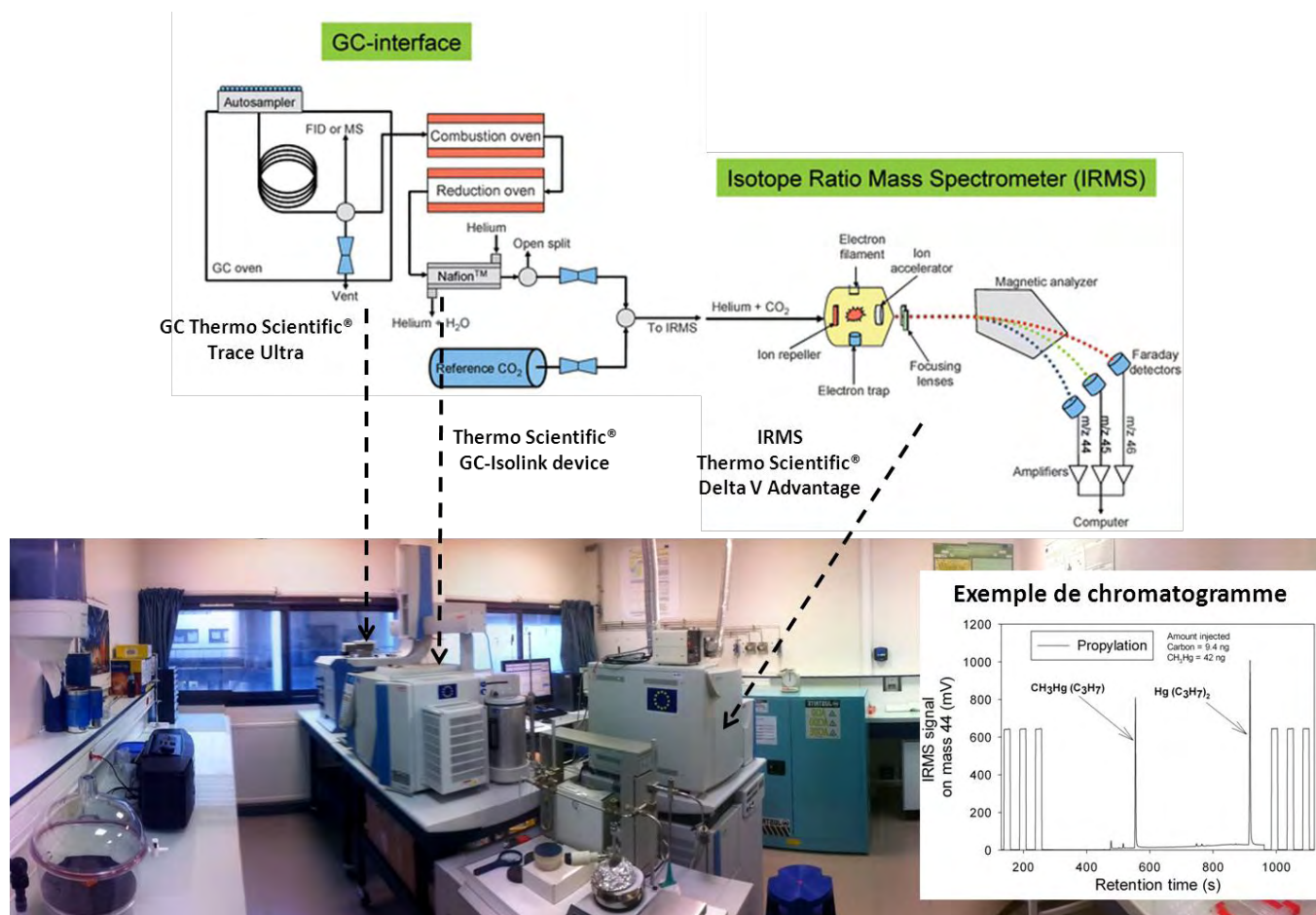


Figure 41: Haut : Schéma descriptif du couplage GC-IRMS utilisé lors de l'analyse de la composition C-CSIA sur MMHg. Adapté de (Muccio and Jackson, 2009)

Bas : Photographie du couplage prise au laboratoire LIENNs de La Rochelle

Chapitre 4.

La tendance temporelle des compositions isotopiques du Hg chez les phoques annelés, reflet de la fonte de la couverture de glace en Alaska

Chapitre 4. La tendance temporelle des compositions isotopiques du Hg chez les phoques annelés, reflet de la fonte de la couverture de glace en Alaska

Résumé

Les concentrations en Hg documentées en haut de la chaîne alimentaire de l'Arctique, particulièrement chez les cétacés et pinnipèdes endémiques, ont montré des valeurs dépassant largement le «Canadian Federal Consumption Guideline» ($0,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sur poids humide). L'exposition au mercure lors de la consommation de ces espèces par les populations du nord est suggérée être l'une des principales causes des symptômes neurologiques observés dans les communautés autochtones à travers des études épidémiologiques à long terme. Les tendances temporelles observées chez les concentrations en Hg de la faune Arctique suggèrent que le Hg d'origine anthropique n'est pas le seul facteur dominant contrôlant leur exposition au Hg.

Dans l'atmosphère de l'Arctique, le Hg est principalement présent sous la forme élémentaire gazeux Hg(0), provenant principalement de sources naturelles d'origine géologique et de sources anthropiques de latitudes intermédiaires. Des conditions uniques de dépôt de Hg (0) pendant le printemps polaire ont longtemps été considérées comme à l'origine des concentrations élevées de Hg mesurées dans la faune de l'Arctique. Cependant, les variations spatiales et temporelles des concentrations de Hg observées chez les mêmes espèces sentinelles répartis sur l'Arctique soulèvent des questions sur les processus et les sources affectant le Hg à des latitudes arctiques.

Alors que les changements récents des émissions de mercure d'origine anthropique ont été suspectés, plusieurs rapports récents suggèrent l'existence d'une explication beaucoup plus complexe. Ajoutant un degré supplémentaire de complexité au cycle Arctique Hg, le forçage climatique a été suggéré comme un facteur potentiel à l'origine des tendances spatiales et temporelles observées.

Parmi les outils d'analyse élémentaire et moléculaire traditionnelles utilisées pour explorer le cycle Hg, Hg signatures isotopiques offrent une approche prometteuse pour étudier les sources de Hg et des procédés de transformation. Dans cette étude nous présentons la spéciation du Hg (Hg inorganique, monométhylmercure) et la composition isotopique (C, N, Hg) de 53 foies de phoques annelés d'Alaska couvrant une période de 14 ans (1988-2002).

Les effets métaboliques et les différences d'habitats ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, âge) expliquent la variation de 1.6‰ en $\delta^{202}\text{Hg}$ observée dans le foie, mais pas $\Delta^{199}\text{Hg}$. Des facteurs externes sont étudiés pour

Chapitre 4. La tendance temporelle des compositions isotopiques du Hg chez les phoques annelés, reflet de la fonte de la couverture de glace en Alaska

expliquer la variation globale de 1‰ en $\Delta^{199}\text{Hg}$. Le $\Delta^{199}\text{Hg}$ des foies de phoques collectés à Barrow montrent une augmentation significative de $+0.38 \pm 0.18$ ($\pm\text{SD}$, $n=5$) en 1988 à $+0.59 \pm 0.18$ ‰ ($\pm\text{SD}$, $n=7$) en 2002 (4.1% par an, $r^2=0.96$, $p^*<0.001$).

L'amplitude de $\Delta^{199}\text{Hg}$ dans les tissus biologiques marins sont connus pour refléter la photochimie marine du Hg avant son assimilation et sa bioaccumulation. Basé sur une analyse spécifique de la couverture de glace prenant en compte l'habitat des phoques, la spéciation du Hg dans le foie et l'âge du phoque, nous suggérons que l'augmentation en $\Delta^{199}\text{Hg}$ est causée par la disparition progressive de la couverture de glace entre 1988 et 2002.

Cette étude est actuellement soumise et en cours de « review » dans le journal Environmental Science & Technology (ACS Publications).

Hg stable isotope time trend in ringed seal registers decreasing sea ice cover in the Alaskan Arctic

*Jérémy Masbou^{*1}, David Point¹, Jeroen E. Sonke¹, Frédéric Frappart¹, Vincent Perrot²,
David Amouroux², Pierre Richard³, Paul R. Becker⁴*

¹Observatoire Midi-Pyrénées, Laboratoire Géosciences Environnement Toulouse, CNRS/IRD/Université Paul Sabatier Toulouse 3, 14 avenue Edouard Belin, 31400 Toulouse, France.

²Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement, Institut Pluridisciplinaire de Recherche sur l'Environnement et les Matériaux, CNRS-UPPA-UMR-5254, Hélioparc, 2 Avenue du Président Pierre Angot, Pau, 64053, France.

³UMR Littoral, Environnement et Sociétés (LIENSs), UMR 7266 CNRS-Université de La Rochelle, Institut du Littoral et de l'Environnement, 2 rue Olympe de Gouges, 17000 La Rochelle, France.

⁴National Institute of Standards and Technology, Analytical Chemistry Division, Hollings Marine Laboratory, 331 Fort Johnson Road, Charleston, South Carolina 29412 USA.

RECEIVED DATE

*Author for correspondence: jeremy.masbou@get.obs-mip.fr

Phone: +33 (0)5 61 33 26 07

Abstract

Decadal time trends of mercury (Hg) concentrations in Arctic biota suggest that anthropogenic Hg is not the single dominant factor modulating Hg exposure to Arctic wildlife. Here, we present Hg speciation (inorganic Hg, monomethyl-Hg) and stable isotopic composition (C, N, Hg) of 53 Alaskan ringed seal liver samples covering a period of 14 years (1988-2002). *In-vivo* metabolic effects and differences in feeding habitat ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ and age) explain the observed 1.6 ‰ variation in liver $\delta^{202}\text{Hg}$, but not $\Delta^{199}\text{Hg}$. External factors are investigated to account for the overall 0.8 ‰ variation in $\Delta^{199}\text{Hg}$. Liver $\Delta^{199}\text{Hg}$ in ringed seals from Barrow increased significantly from $+0.38 \pm 0.18\text{‰}$ ($\pm\text{SD}$, $n=5$) in 1988 to $+0.59 \pm 0.18\text{‰}$ ($\pm\text{SD}$, $n=7$) in 2002 (4.1% per year, $r^2=0.96$, $p^* < 0.001$). $\Delta^{199}\text{Hg}$ in marine biological tissues is thought to reflect marine Hg photochemistry before bio-uptake and bio-accumulation. Based on a sea ice cover analysis that accounts for the habitat of ringed seals, liver Hg speciation and seal age, we suggest that the observed increase in $\Delta^{199}\text{Hg}$ is caused by the progressive summer sea ice disappearance between 1988 and 2002.

KEYWORDS : mercury, stable isotopes, bio-monitor, ringed seal, sea ice, mass independent fractionation, Arctic warming

Introduction

Mercury (Hg) is a global pollutant that may induce irreversible effects on human health. The Arctic has long been hypothesized to act as a direct sink for this element (Ariya et al., 2004), although recent studies suggest more complex cycling (Dastoor and Durnford, 2013). Mercury concentrations at the top of the Arctic marine food chain, documented in particular in endemic cetaceans and pinnipeds, were found to exceed the Canadian Federal Consumption Guideline ($0.5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ wet weight) (Wagemann et al., 1996). Mercury exposure from consumption of these species by northern populations is suggested to be one of the main causes of neurological symptoms observed in the native communities through long-term epidemiological studies (Van Oostdam et al., 2005).

In the Arctic atmosphere, Hg is mainly present as gaseous elemental Hg(0) originating mainly from global natural geogenic sources and from mid-latitude anthropogenic sources (Outridge et al., 2008). Unique Arctic depositional conditions of Hg(0) during the springtime were long thought to be at the origin of the elevated Hg concentrations measured in Arctic biota (AMAP, 2011; Steffen et al., 2005). However, the contrasting spatial and temporal variations of Hg concentrations observed in the same sentinel species distributed across the Arctic raise questions about the processes and sources affecting Hg at Arctic latitudes (Rigét et al., 2011). While decadal changes in anthropogenic Hg emissions have been hypothesized (Dietz et al., 2009; Outridge et al., 2009), several recent reports investigating trends of Hg concentrations in biomonitoring species suggest a more complex picture (AMAP, 2011; Gaden et al., 2009; Rigét et al., 2012). Recent climate change forcing has therefore been suggested as a potential factor to explain decadal spatial trends (Point et al., 2011; Stern et al., 2012), adding an additional degree of complexity to the Arctic Hg cycle.

Among the traditional elemental and molecular analytical tools used to explore the Hg cycle, Hg stable isotope signatures offer a promising approach to investigate Hg sources and transformation processes (Bergquist and Blum, 2009). Mercury is one of three elements on Earth that display both mass dependent isotopic fractionation (MDF), and mass independent isotopic fractionation (MIF). Mercury MDF has been documented for processes such as abiotic and bacterial reduction of inorganic Hg (iHg), volatilization of Hg(0), liquid-vapour evaporation, bacterial methylation and demethylation, ecological interactions and bioaccumulation in aquatic food chains (Bergquist and Blum, 2009; Yin et al., 2010). Odd isotope Hg MIF in biota is thought to be reflect the aquatic photo-reduction conditions of iHg and photodemethylation of monomethylHg (MMHg) in the presence of dissolved organic matter (Bergquist and Blum, 2007; Zheng and Hintelmann, 2009). Several studies of aquatic biota have revealed positive and negative $\delta^{202}\text{Hg}$ values associated with almost exclusively positive $\Delta^{199}\text{Hg}$ values up to 5 ‰ (Bergquist and Blum, 2007; Blum et al., 2013; Point et al., 2011; Sonke, 2011).

While Hg isotopic fractionation during trophic transfer has been a subject of debate (Das et al., 2009; Jackson et al., 2008), recent field observations (Day et al., 2012; Perrot et al., 2010; Point et al., 2011) and laboratory experiments (Kwon et al., 2012) concluded to the absence of in vivo processes behind Hg MIF. This suggests that Hg MIF signatures in top predators of a given food chain may be used to investigate the Hg cycle at the baseline of the ecosystem; i.e the marine/aquatic Hg cycle, and in particular the photodegradation conditions of Hg compounds in the surface waters. Recent work, on the spatial variations of Hg isotope signatures in seabird eggs from different Alaskan Arctic and sub-Arctic latitudes illustrated the local influence of sea ice conditions on bioaccumulated Hg MIF signature, suggesting that climate change may directly influence the Hg cycle (Point et al., 2011).

The present study complement the previous work on Hg isotopes in seabird eggs by investigating the long-term temporal variations of Hg isotope signatures in the same Alaskan Arctic region using cryogenically archived ringed seal (*Pusa hispida*) liver collections. Ringed seal is a key Arctic sentinel species strongly associated with the sea ice ecosystem, showing high inter-annual breeding site fidelity (Kelly et al., 2010a). These properties make this species particularly useful used for investigating spatial or temporal trends of contaminants in the Arctic (Riget et al., 2006), including Hg (Gaden et al., 2009; Rigét et al., 2011; Riget et al., 2012). Hg stable isotope signatures were determined in archived liver samples of ringed seals collected over 14 years from 1988 to 2002. Complementary information on Hg speciation and ecological tracers ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) is also considered to investigate the influence of in vivo metabolic, ecological, geographical, and time trend factors affecting Hg isotopes signatures.

Materials and Methods

Sampling

Cryogenically archived fresh frozen ringed seal (*Pusa hispida*) liver samples were obtained from the Marine Environmental Specimen Bank (Marine ESB) at the National Institute of Standards and Technology (NIST, Charleston, SC, USA). Samples were collected and archived since 1987 as part of the Alaska Marine Mammal Tissue Archival Project (AMMTAP). A total of 53 ringed seal liver samples from two different Alaskan locations, Barrow (71°19'N, 156°45'W, n=39) and Nome (64°22'N, 165°39'W, n=14) were analysed (Figure 1). Samples from Nome and Barrow were collected every year from May 11th to June 2nd, and from June 30th to July 19th respectively. The timing of collection corresponds to the presence of sea ice at both locations, with ringed seals returning to their respective seasonal sea ice breeding location every year. Sampling protocol and collection has been previously detailed (Becker et al., 1991).



Figure 1: Map of the Arctic study zone. The two ringed seal sampling sites are represented by a filled black square (Nome) and an open black triangle (Barrow). Home Ranges were determined from satellite telemetric studies (Crawford et al., 2012; Harwood et al., 2012b) and 100m depth contours as detailed in the method section. Red and blue shaded areas represent the home ranges of individuals sampled in Barrow and Nome respectively. Overlapped habitat is indicated in black.

All samples were analysed for total Hg concentrations (HgT), Hg isotopic composition and light stable isotopes ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$). Selected samples were also analysed for MMHg concentrations. Complementary information on seal ages estimated from claw or teeth growth rings and sex is also available.

Sample analysis

Carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) isotope ratios were measured on defatted sample fractions (Bligh and Dyer, 1959) by Elemental Analysis - Isotope Ratio Mass Spectrometry (EA-IRMS) at the Stable Isotope Facility of LIENSs laboratory (La Rochelle, France). External instrument reproducibility for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ was typically $\pm 0.1\text{‰}$ ($\pm\text{SD}$). Total Hg concentrations (expressed on a wet weight basis, ww) on fresh frozen samples were determined in triplicate by atomic absorption spectrometry after combustion and gold trapping using a DMA-80 analyser (Milestone, USA) at the

GET laboratory (Toulouse, France). Measurements accuracy was checked against reference materials DORM-2 (freeze dried dogfish muscle), SRM 1947 (fresh frozen fish tissue) and an in-house matrix reference material NIST QC03LH03 (fresh frozen whale liver control material), see Table S1 for details.

Methylmercury concentration measurements were performed on selected samples at the LCABIE laboratory (Pau, France), by isotope dilution gas chromatography inductively coupled plasma and mass spectrometry (ID-GC-ICPMS) (Monperrus et al., 2003). Measurement accuracy was tested on the certified reference material DOLT-4. Recovery for MMHg ranged from 95-105% (Table S2). Inorganic Hg (iHg) concentrations were estimated as the difference between HgT measurements (DMA 80) and MMHg concentration determinations (ID-GC-ICPMS).

Mercury isotopic compositions were measured at the Observatoire Midi-Pyrenees (Toulouse, France) using multi-collector inductively coupled plasma mass spectrometry (MC-ICP-MS; Thermo Finnigan Neptune) with continuous flow cold vapour (CV) generation using Sn(II) reduction (CETAC HGX-200). Mercury isotopic composition is expressed in δ notation and reported in parts per thousand (‰) deviation from NIST SRM 3133 standard, which was determined by sample-standard bracketing according to the following equation:

$$\delta^{xxx}\text{Hg} = \left[\left(\frac{\left(\frac{^{xxx}\text{Hg}}{^{198}\text{Hg}} \right)_{\text{sample}}}{\left(\frac{^{xxx}\text{Hg}}{^{198}\text{Hg}} \right)_{\text{NIST 3133}}} \right) - 1 \right] \times 1000 \quad (\text{‰})$$

where xxx represents the mass of each Hg isotope

Mass independent fractionation (MIF) is expressed by the Δ notation:

$$\Delta^{199}\text{Hg}(\text{‰}) = \delta^{199}\text{Hg} - (\delta^{202}\text{Hg} \times 0.252)$$

$$\Delta^{200}\text{Hg}(\text{‰}) = \delta^{200}\text{Hg} - (\delta^{202}\text{Hg} \times 0.502)$$

$$\Delta^{201}\text{Hg}(\text{‰}) = \delta^{201}\text{Hg} - (\delta^{202}\text{Hg} \times 0.752)$$

Sample preparation is detailed in the ESI. Briefly, final solutions containing between 1 to 5 ng Hg.g⁻¹ and matching NIST 3133 concentration within 15% were analysed by CV-MC-ICP-MS.

Depending on the sample mass available for analysis, sample measurements were repeated between 1 to 4 times. Reported values consist in Mean \pm 2SD among these replicates. Long-term reproducibility between the different analytical batches was evaluated using a matrix-matched whale liver QC03LH03 NIST in-house control material. Measurements performed for this material at different concentrations highly consistent in terms of precision and accuracy (Table S3). Overall, a reproducibility of 0.14‰ and 0.11‰ (\pm 2SD, n=31) was observed for $\delta^{202}\text{Hg}$ and $\Delta^{199}\text{Hg}$ respectively for this material. We applied QC03LH03 2SD uncertainties to all samples, unless 2SD on replicate sample analyses were larger. Secondary reference material UM-Almaden was also analysed, with $\delta^{202}\text{Hg}$ values of $-0.53\pm 0.10\text{‰}$ (\pm 2SD, n=46). These measurements were in agreement with other published values (Table S3) (Bergquist and Blum, 2007).

Sea ice satellite data processing

Global sea ice concentration data from the Special Sensor Microwave/Imager (SSM/I) used by the Defence Meteorological Satellite Program (DMSP) were used in this study. Data were reprocessed by the EUMETSAT Ocean and Sea Ice Satellite Application Facility (EUMETSAT OS-ISAF) providing a spatial resolution of 12.5 km in an equal grid area format at a daily time resolution (EUMETSAT). Sea ice concentration parameters were previously defined as key variables for tracking changes in migration/movement or diet in marine for Arctic marine top predators ((Moore and Laidre, 2006; Point et al., 2011), and ringed seals in particular (Gaden et al., 2009). Analysis of Alaskan ringed seals diving patterns indicated that most individuals forage between surface waters and a maximum depth of 100 m over the continental shelf (Crawford et al., 2012; Harwood et al., 2012b). In this study, we estimated the daily, monthly, and annual average sea-ice concentration data integrated over the known spatial habitat of Ringed seals between 1979 and 2009. The spatial habitat of ringed seals considered in this study is derived from satellite telemetry studies (Crawford et al., 2012; Harwood et al., 2012b) and represents an area integrating their maximum migration ranges with applying a bathymetry restriction of 100m (Figure 1). The bathymetry data considered is the global seafloor topography obtained from satellite altimetry and ship depth sounding offering a spatial resolution of 2' (Smith and Sandwell, 1997). To tackle the problem of the difference of spatial resolutions between bathymetry (2') and the sea ice concentration (25 km) data, the percentage of gridpoints with a depth lower than 100 m in a SSM/I pixel was estimated, and this ratio was used to weight the sea-ice concentration of each pixel.

Statistics

Statistical analyses were performed using JMP® software (SAS Institute, USA). One-way ANOVA were performed when comparing two datasets. Homogeneity of variances was tested using the Brown-Forsythe test. In the case of unequal variances, a Welch ANOVA test was used. Time-trend

analysis was performed using the PIA software developed specifically by the Arctic Monitoring and Assessment Programme (Wilson, 2007) for investigating Hg temporal trends and to check for the adequacy of the dataset. The basic statistical methodology applied when running PIA is a robust regression-based analysis to detect trends in time-series datasets (Nicholson et al., 1998). It includes log-linear regression analyses where the slope of the line describes the change in concentration/isotopic composition (e.g., annual percentage). A Mann-Kendall trend test is also applied on the dataset, corresponding to a non-parametric alternative to the regression analysis. Hence, the Kendall's 'tau' value and the corresponding p-value are reported.

Ringed seal ecology in the Alaskan Arctic

Mercury exposure to Arctic top predators is affected by several factors such as the length of the food chain, habitat use and prey-predator interactions (Atwell et al., 1998; Stern et al., 2012). Ringed seals is an opportunistic and euryphagous species, feeding heavily on fish (arctic/polar cod, Pacific sand lance) and crustaceans (Euphausiacea, Mysidacea, Zooplankton, Amphipoda, Northern Shrimp) (Dehn et al., 2007). In the Alaskan Arctic, satellite-tagging studies (Kelly et al., 2010a; Smith and Hammill, 1981) investigating the same ringed seals groups as in this study showed that ringed seals breeding in the Nome and Barrow regions return back to their exact respective breeding site every year (Kelly et al., 2010a). Following the seasonal movement of shore fast and pack ice, ringed seals from Nome migrate from the Bering Sea in winter to the Chukchi Sea in spring/summer foraging over the continental shelf (Crawford et al., 2012). Individuals from Barrow occupy a slightly northern habitat, wintering in the western Chukchi Sea and northern Bering Sea, and migrating during spring and summer eastward, parallel to the continental shelf break towards the eastern Beaufort sea. Besides showing strong breeding site fidelity, field observations and satellite telemetry studies also show similar inter-annual foraging range at the population level (Harwood et al., 2012a; Kelly et al., 2010a; Kelly et al., 2010b) (Figure 1).

Results and discussion

HgT and MMHg concentrations, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{202}\text{Hg}$ and $\Delta^{199}\text{Hg}$ are summarized in Table S4. No statistical sex differences could be detected for the following variables; age, HgT and MMHg concentrations, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{202}\text{Hg}$, $\Delta^{199}\text{Hg}$, one-way ANOVA, $p > 0.05$), so male and female data were subsequently pooled for further analysis. Mean HgT concentrations in ringed seals liver samples were $2.7 \pm 3.4 \mu\text{g.g}^{-1}$ ww (\pm SD, $n=53$), ranging from 0.09 to $13.9 \mu\text{g.g}^{-1}$ ww. These results are consistent with observations for ringed seals from the same region (Barrow, Alaska) and in Greenland but much lower than in the Canadian Western and Eastern Arctic (see Table S5 for comparison, (Riget et al., 2005)). Adults from Barrow show higher liver HgT concentrations (Welch ANOVA test, $p^* < 0.01$,

n=38) than juveniles. This leads to a weak but significant effect of on age on HgT ($r^2=0.22$, $p^*<0.01$, n=38, Figure S1), likely reflecting Hg bioaccumulation.

Mercury stable isotope compositions are illustrated in Figure 2. Significant variations could be determined for both Hg MDF and Hg MIF among all samples. Hg MDF ($\delta^{202}\text{Hg}$) ranged between -0.87 ‰ and 0.72 ‰ with a mean value of -0.17 ± 0.33 ‰ ($\pm\text{SD}$, n=53). Hg MIF ($\Delta^{199}\text{Hg}$) was found to be exclusively positive, ranging between 0.07 and 1.04 ‰ with a mean value of 0.51 ± 0.17 ‰ ($\pm\text{SD}$, n=53). Influence of fractionation processes such as the liver metabolism, ecological factors, and marine biogeochemical cycle of Hg are discussed in the following sections.

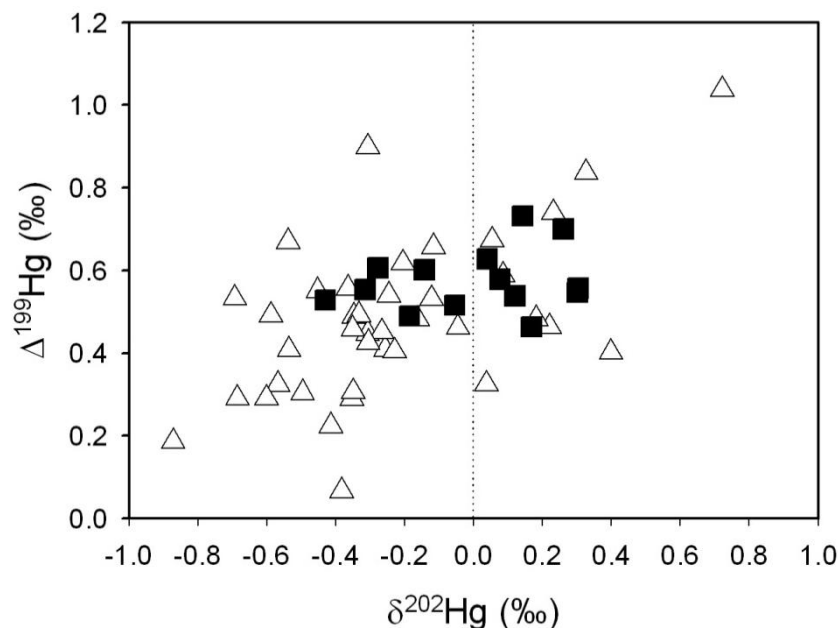


Figure 2: Mercury MDF ($\delta^{202}\text{Hg}$) vs. MIF ($\Delta^{199}\text{Hg}$) diagram for the 53 ringed seal liver samples analysed in this study. Black squares and white triangles represent ringed seal livers collected at Nome and Barrow respectively.

Influence of in vivo hepatic processes

Mercury speciation analysis on selected liver samples from Barrow (n=18, Table S4) showed that iHg fractions accounted for 61 to 98% of HgT, with a mean value of 86 ± 12 % ($\pm\text{SD}$, n=18). This is consistent with studies on ringed seals (Smith and Armstrong, 1978) and other mammalian livers (Zeisler et al., 1993). MMHg fractions were found to decrease (power law fit, $r^2=0.94$, $p^*<0.0001$) as a function of HgT concentration (Figure S2) (Becker et al., 2000). This trend is indicative of active hepatic MMHg demethylation as suggested in other reference studies (Eagles-Smith et al., 2009; Wagemann et al., 2000). This may have three important implications for using of ringed seal liver tissue as a Hg isotope biomonitor. First, while liver HgT is predominantly in the form of iHg, iHg represents the reaction product of in vivo hepatic MMHg breakdown (Becker et al., 2000; Lailson-

Brito et al., 2012). Only a small and most likely irrelevant fraction of liver iHg may have been ingested as iHg (Bloom, 1992). Therefore, liver HgT isotopic composition is thought to reflect the isotopic composition of MMHg ingested by seals. Second, hepatic MMHg demethylation into iHg products may potentially induce Hg isotope fractionation and must be taken into account (Perrot et al., 2012). Third, iHg and MMHg half-lives in liver may thus differ and therefore affect the time period of MMHg exposure represented. Detailed attention to Hg species distribution in ringed seals liver detailed in (Wagemann et al., 2000) indicated that about 50% of liver iHg fraction consists of insoluble HgSe compounds exhibiting a half-life of approximately 500 days. The remaining iHg 50% fraction and liver MMHg fractions were observed to be bound to proteins containing S-ligands and other labile low molecular weight organic complexes exhibiting a much shorter half-life of about 20 days (Tillander et al., 1970; Wagemann et al., 2000). See also ESI for details. These observations suggest that bulk liver HgT isotope signatures may thus reflect a mixture of recent (≈ 1.5 -2 months) and much longer (≈ 1.5 -2 years) MMHg exposure.

Figure 3 illustrated the possible influence of in vivo hepatic MMHg breakdown into iHg compounds on Hg stable isotope signatures ($\delta^{202}\text{Hg}$ and $\Delta^{199}\text{Hg}$). Statistical analysis showed a significant relationship between log (MMHg fraction) and $\delta^{202}\text{Hg}$ ($r^2=0.34$, $p^*<0.05$, $n=18$), suggesting that the larger presence of MMHg fractions, lead to a bulk HgT signature enriched in heavier isotopes. This implicates that hepatic MMHg demethylation likely produces iHg compounds enriched in light isotopes. Consequently, the residual liver MMHg fraction becomes oppositely enriched in heavier isotopes. As also shown in Figure 3, the regression trend was found even stronger while expanding the MMHg dataset ($n=18$) with complementary estimated values ($n=21$) obtained from the MMHg fraction vs HgT trend ($r^2=0.48$, $p^*<0.0001$, $n=39$, Figure S2). Recent laboratory experiments have shown that the microbial degradation of MMHg also enriches the iHg product fraction in lighter Hg isotopes (Kritee et al., 2009). Preliminary work on the compound specific Hg isotopic composition of MMHg in seal liver also confirmed by independent measurements that the liver iHg fraction showed lower $\delta^{202}\text{Hg}$ signature relative to its MMHg counterpart fraction (Perrot et al., 2012). These results suggest that Hg MDF is induced during in vivo hepatic MMHg breakdown, and that it explains much of the $\delta^{202}\text{Hg}$ variability among ringed seal livers ($r^2=0.48$). In addition to speciation sensitivity (Figure 3), $\delta^{202}\text{Hg}$ and log (MMHg fraction) values decrease significantly with age ($r^2=0.18$, $p^*<0.01$, $n=38$ and $r^2=0.32$, $p^*<0.05$, $n=18$ respectively). These relationships, with however lower statistical parameters, may also reveal a preferential excretion of lighter isotopes (or retention of heavier isotopes) over the individual life.

On the contrary, no relationship was found between Hg MIF ($\Delta^{199}\text{Hg}$) relative to the log MMHg fraction (Figure 3, $r^2=0.07$, $p=0.11$, $n=39$) or age ($r^2=0.03$, $p=0.28$, $n=38$), likely suggesting that hepatic demethylation does not induce Hg MIF, but only MDF. This conclusion is consistent with

Chapitre 4. La tendance temporelle des compositions isotopiques du Hg chez les phoques annelés, reflet de la fonte de la couverture de glace en Alaska

several studies reporting the absence of Hg MIF during biological processes (Kritee et al., 2009; Kwon et al., 2012; Laffont et al., 2009).

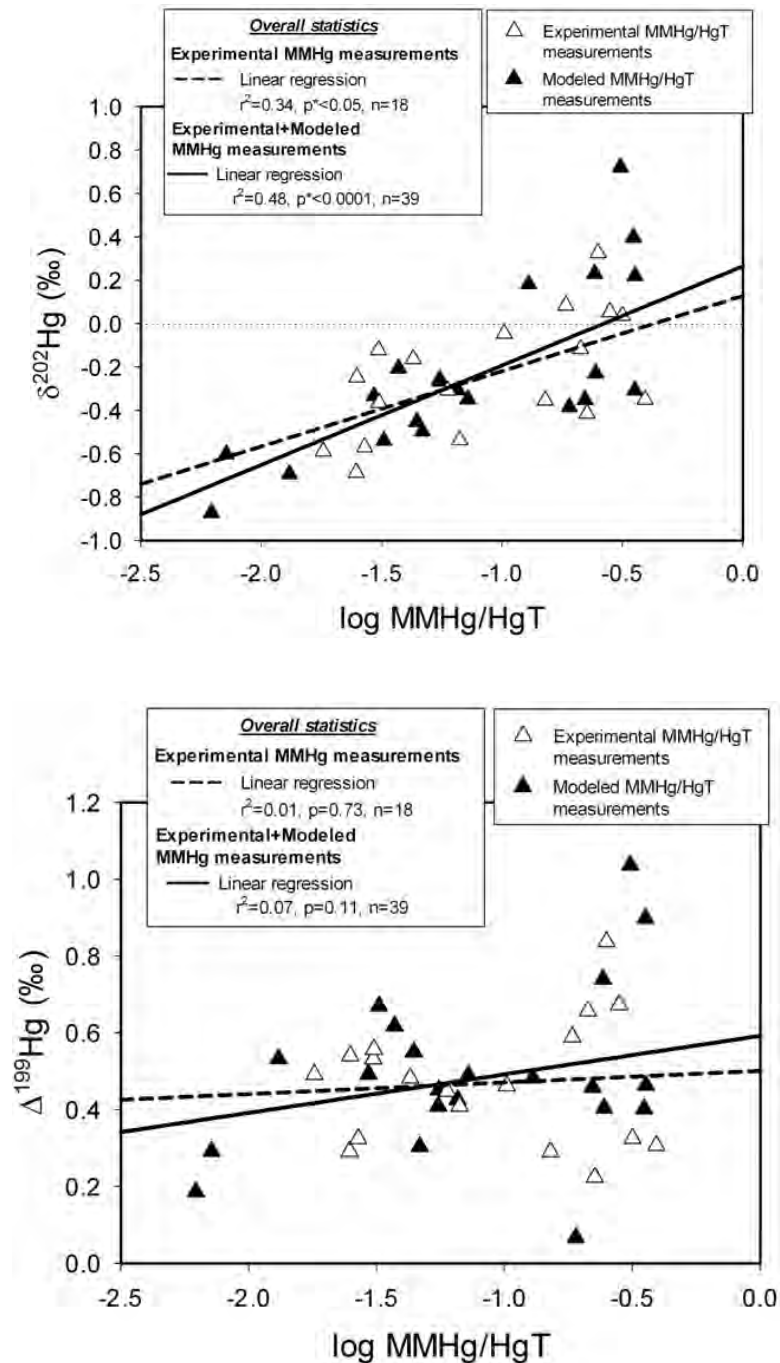


Figure 3: Influence of Hg speciation ($\log \text{MMHg}/\text{HgT}$) on Hg MDF ($\delta^{202}\text{Hg}$, top) and MIF ($\Delta^{199}\text{Hg}$, down) on ringed seal livers collected at Barrow, Alaska. White filled triangles show the MMHg/HgT data obtained by ID-GC-ICPMS. Black filled triangles show the MMHg/HgT data obtained by using the MMHg/HgT vs HgT relationship presented in Figure S3.

Influence of foraging ecology and habitat use

Nome vs Barrow

Ringed seals individuals from Nome and Barrow share a partial overlap in their habitat (Figure 1, (Crawford et al., 2012; Harwood et al., 2012b)). Given the presence of a large set of non-adults individuals from the Nome population (n=8) relative to the total number of individuals analyzed (n=10), HgT comparison has been made considering juveniles only (0-5 yrs). Bias from the larger collection period for Barrow samples (1988-2002) compared to Nome (1989-1997) have been investigated through time trend analysis. The absence of statistically significant time trend (PIA software, $p > 0.05$, Barrow, n=39) for HgT, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{202}\text{Hg}$ parameters allow to consider the whole dataset from Barrow (1988-2002, n=39) without time period restriction. On the contrary, since collection date has been found to be a confounded factor for $\Delta^{199}\text{Hg}$ signatures in Barrow ($p^* < 0.001$, detailed in the following section), similar period have been taken for comparing the $\Delta^{199}\text{Hg}$ values integrated in Nome (1989-1997, n=14) and Barrow (1988-1999, n=25) ringed seals.

Similar HgT concentrations (one-way ANOVA, $p = 0.48$, n=29) were determined for juvenile ringed seals in Barrow ($1.2 \pm 2.0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ww, SD, n=18) and Nome ($1.8 \pm 1.7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ww, SD, n=11). Liver $\delta^{13}\text{C}$ show no statistical differences (one-way ANOVA, $p = 0.54$, n=39) between Barrow ($-18.6 \pm 0.8\text{‰}$, SD, n=39) and Nome ($-18.7 \pm 0.6\text{‰}$, SD, n=14), consistent with previously published values for ringed seals from the same region ($\delta^{13}\text{C} = -18.5 \pm 0.8\text{‰}$, n=82, (Dehn et al., 2006)). This suggests that ringed seals from the Northern Alaskan Arctic region feed on the same relatively large and homogeneous carbon source. The carbon isotope signature in ringed seals samples is consistent with a marine carbon source as determined in murre eggs collected in the Bering Strait, nearby Saint Lawrence island (-20.9‰ to -18.7‰), compared to estuarine $\delta^{13}\text{C}$ signatures (-23.3‰ to -20.0‰) from the Norton Sound Area (Alaska) (Day et al., 2012). On the contrary, juvenile $\delta^{15}\text{N}$ values are significantly different between Barrow ($16.9 \pm 0.9\text{‰}$, SD, n=39) and Nome ($18.9 \pm 1.0\text{‰}$, SD, n=14, one-way ANOVA, $p^* < 0.001$), consistent with $\delta^{15}\text{N}$ values of $16.9 \pm 0.6\text{‰}$ previously observed in ringed seals from Barrow (\pm SD, n=78, (Dehn et al., 2006; Hoekstra et al., 2002)). Calanoid copepods in the Nome region exhibit $\delta^{15}\text{N}$ values of 12-14‰ against 10-12‰ in Barrow, confirming that Nome and Barrow seal $\delta^{15}\text{N}$ signatures reflect the natural $\delta^{15}\text{N}$ baseline difference that exists between the two regions. This baseline difference suggests that ringed seals from both regions likely feed at a similar trophic level (Schell et al., 1998).

Significantly lower $\delta^{202}\text{Hg}$ (one-way ANOVA, $p^* < 0.01$, n=53) and $\Delta^{199}\text{Hg}$ (Welch ANOVA test: $p^* < 0.05$, n=39) are observed for Barrow ($\delta^{202}\text{Hg} = -0.24 \pm 0.33\text{‰}$ and $\Delta^{199}\text{Hg} = 0.46 \pm 0.21\text{‰}$, SD) compared to Nome ($\delta^{202}\text{Hg} = 0.00 \pm 0.34\text{‰}$ and $\Delta^{199}\text{Hg} = 0.57 \pm 0.07\text{‰}$, SD). Correlating liver HgT, $\delta^{202}\text{Hg}$ and $\Delta^{199}\text{Hg}$ with liver $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ may identify ecological controls (habitat, trophic level) on

Hg exposure, if the elements Hg, C, and N have similar turn-over rates in liver. This is likely the case for labile iHg and MMHg compounds in liver (50-70% of HgT), with a similar half-life of 20 days to C and N, but not for insoluble HgSe compounds (30-50% of HgT). Bearing in mind this partial decoupling between Hg and C, and N isotopes, we do not find significant HgT vs. $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{202}\text{Hg}$ vs. $\delta^{13}\text{C}$ nor $\Delta^{199}\text{Hg}$ vs. $\delta^{13}\text{C}$ trends (Figure S3). Slight but significantly negative $\delta^{202}\text{Hg}$ vs. $\delta^{15}\text{N}$ ($r^2=0.14$, $p^*<0.05$, $n=39$) and positive HgT vs. $\delta^{15}\text{N}$ ($r^2=0.27$, $p^*<0.001$, $n=39$) relationships were observed for Barrow samples (Figure S3), suggesting a possible influence of prey trophic level or prey origin on Hg exposure and $\delta^{202}\text{Hg}$. We do not observe a $\Delta^{199}\text{Hg}$ vs. $\delta^{15}\text{N}$ relationship (Figure S3) suggesting that Hg MIF is likely not significantly influenced by the foraging ecology of ringed seals.

While the majority of seal liver $\delta^{202}\text{Hg}$ variations can be explained by metabolism (MMHg fraction, $r^2=0.48$) and ecology ($\delta^{15}\text{N}$, $r^2=0.14$), $\Delta^{199}\text{Hg}$ does not co-vary with these parameters. Other factor(s) may likely be at the origin of the difference in $\Delta^{199}\text{Hg}$ observed between Barrow and Nome ringed seals, and the observed $\Delta^{199}\text{Hg}$ variations in general. In a previous marine seabird bio monitor Hg isotope study we showed that a latitudinal MIF gradient exists across the Bering Sea from the North Pacific Ocean to the Arctic Ocean (Point et al., 2011). We argued that the south to north decrease in MIF reflects the influence of the sea ice gradient on photochemical breakdown of MMHg and associated MIF, in surface sea water. $\Delta^{199}\text{Hg}$ signatures of biomonitor tissues, such as bird eggs or seal livers, are therefore thought to trace the aquatic photochemistry of MMHg (Bergquist and Blum, 2007; Blum et al., 2013). Seabird egg collected at Cape Lisburne (69°N), close to Barrow (71°N) showed $\Delta^{199}\text{Hg}$ values of $0.49\pm 0.11\text{‰}$ ($\pm\text{SD}$, $n=5$, (Point et al., 2011)), identical to the signature determined in Barrow ringed seals ($\Delta^{199}\text{Hg}=0.48\pm 0.19\text{‰}$, SD , $n=39$). The significantly higher $\Delta^{199}\text{Hg}$ signature measured in ringed seals sampled at Nome (64°N), by $\approx 0.1\text{‰}$ ($0.57\pm 0.07\text{‰}$, SD , $n=14$), is therefore consistent with the seabird $\Delta^{199}\text{Hg}$ latitude gradient.

Time trends

Time trend analysis using the statistical model proposed by AMAP (see method section for details) showed that no statistically significant time trend could be detected for HgT, log HgT, $\delta^{202}\text{Hg}$, $\delta^{13}\text{C}$ (Figure S4), $\delta^{15}\text{N}$ (Figure S4) except for $\Delta^{199}\text{Hg}$ between 1988 and 2002 (Figure 4). We evaluated the robustness of the dataset for $\Delta^{199}\text{Hg}$ time trend analysis (using “adequacy” calculations recommended by the AMAP (Bignert et al., 2004)), and found that the ringed seal dataset from Barrow is sufficiently robust ($\text{adequacy}>1$). Annual index ringed seal liver $\Delta^{199}\text{Hg}$ values increase significantly from $0.38\pm 0.18\text{‰}$ ($\pm\text{SD}$, $n=5$) in 1988 to $0.59\pm 0.18\text{‰}$ ($\pm\text{SD}$, $n=7$) in 2002. This represents a significant and continuous annual rate increase of 4.2 % of Hg MIF between 1988 and 2002 ($r^2=0.96$, $p^*<0.001$, with 95% confidence interval (CI) of 3.0-5.4%, Figure 4). The absence of significant time trends for HgT, $\delta^{202}\text{Hg}$, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, except and sensitive enough for $\Delta^{199}\text{Hg}$ suggests, that the Hg MIF time trend may not be confounded by metabolic, ecological and/or foraging effects.

Rather, a change in MMHg photochemistry that operate at habitat level integrated by ringed seals between 1988 and 2002 may be likely be at play.

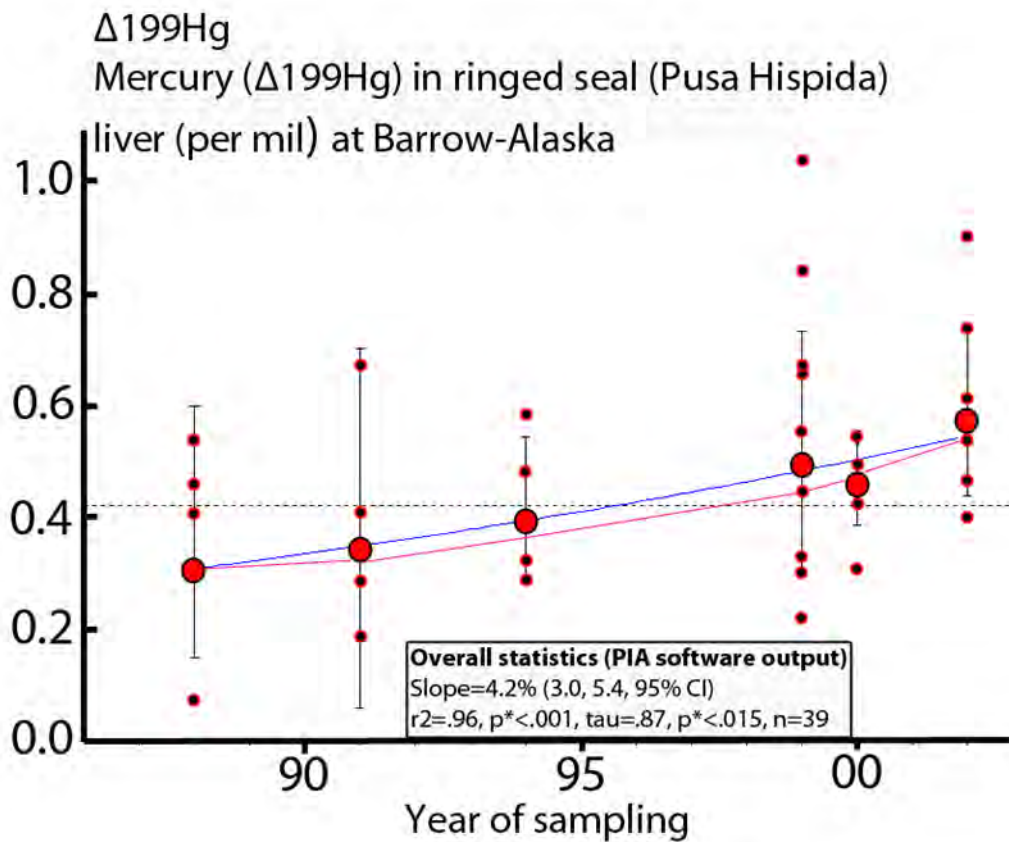


Figure 4: Temporal evolution of MIF $\Delta^{199}\text{Hg}$ (%) for all samples from Barrow ($n=39$). Small dots correspond to original data points and bigger ones are the annual index values. Vertical error bars correspond to the 95% confidence interval. Blue line is log-linear regression trend line and pink line fit moving average. Horizontal dashed line is the overall geometric mean value.

As shown in the ESI section (Figure S5) no relationship between annual average solar radiation in Barrow (from (Bernhard, 2011)) and $\Delta^{199}\text{Hg}$ were observed. This indicates that solar radiation fluxes might not be the dominant cause of the Hg MIF temporal trend. However, it is well documented that summer sea ice extent show significant inter-annual variations and has also heavily decreased over the past two decades in the study area in relation with global warming (Figure S6, (Rigor and Wallace, 2004; Stroeve et al., 2012)). Point et al. (2011) have previously suggested that by blocking sunlight and limiting ocean atmosphere Hg^0 exchanges, sea ice cover may represent a significant player driving the photochemical MMHg breakdown and associated Hg MIF in the Arctic (Point et al., 2011).

Because HgT isotope signatures in ringed seals liver are thought to reflect a snapshot exposure of both recent and old MMHg integrated over the life time of ringed seals, estimating the proper time window representative of the liver HgT signature for each ringed seal individual is key to intercompare with sea ice concentration data over the same period of time. To achieve this, we developed a Hg pharmacokinetic (PK) weighting model for estimating a much representative and proper MMHg exposure time for each individual. Modelled MMHg exposure time values for each ringed seal individual were then applied starting from their birth date (estimated from the difference between the time of capture and its age) to determine a corresponding sea ice concentration value (%) over the same period, and using daily satellite sea ice concentration data integrated over their respective spatial habitat (See method section for details). In brief, and following literature reference half time data for Hg compounds in ringed seal livers (Tillander et al., 1970; Wagemann et al., 2000), half of the liver iHg species were assumed to be insoluble HgSe compounds with a long 500-day half-life; the other half of iHg and MMHg species were considered labile with a 20-day half-life (see ESI for details). We then calculated for each ringed seal individual of known age the fraction of MMHg exposure that correspond to each day of its life, and that is still present as part of HgT in seal's liver. Corresponding sea ice concentration data for each of these days spatially integrated over their respective habitat (delimited by depth contours and home ranges) were estimated in parallel and combined (C_{ice}) for comparison to Hg MIF signatures. Mean annual liver $\Delta^{199}\text{Hg}$ values were plotted against their corresponding PK weighted C_{ice} values (Figure 5). While the $\Delta^{199}\text{Hg}$ and C_{ice} combination for seals sampled in 1991 in Barrow exhibited likely outlier values, all other years defined a strong negative linear trend ($r^2=0.89$, $p^*<0.001$, $n=8$) evidencing a relationship between Hg MIF and Sea ice concentrations. Integrating C_{ice} data over the 3 months (no PK adjustment) prior to seal capture (April-June and March-May for Barrow and Nome respectively) showed also a significant trend but weaker trend with $\Delta^{199}\text{Hg}$ ($r^2=0.70$, $p^*<0.01$, $n=8$), but is considered less appropriated. Interestingly, ringed seal individuals from Barrow and Nome align on the same trend, confirming that sea-ice cover conditions is a significant factor explaining both geographical and temporal trends in Hg MIF. This result is consistent with the observed latitudinal gradient in sea bird egg $\Delta^{199}\text{Hg}$ within the same Alaskan region (Point et al., 2011). We suggest that the gradual decrease in sea ice cover between 1988 and 2002, integrated over the foraging habitat of murrees and ringed seals, has intensified marine Hg photochemistry. The anticipated further decline in summer sea-ice extent will likely enhance this phenomenon.

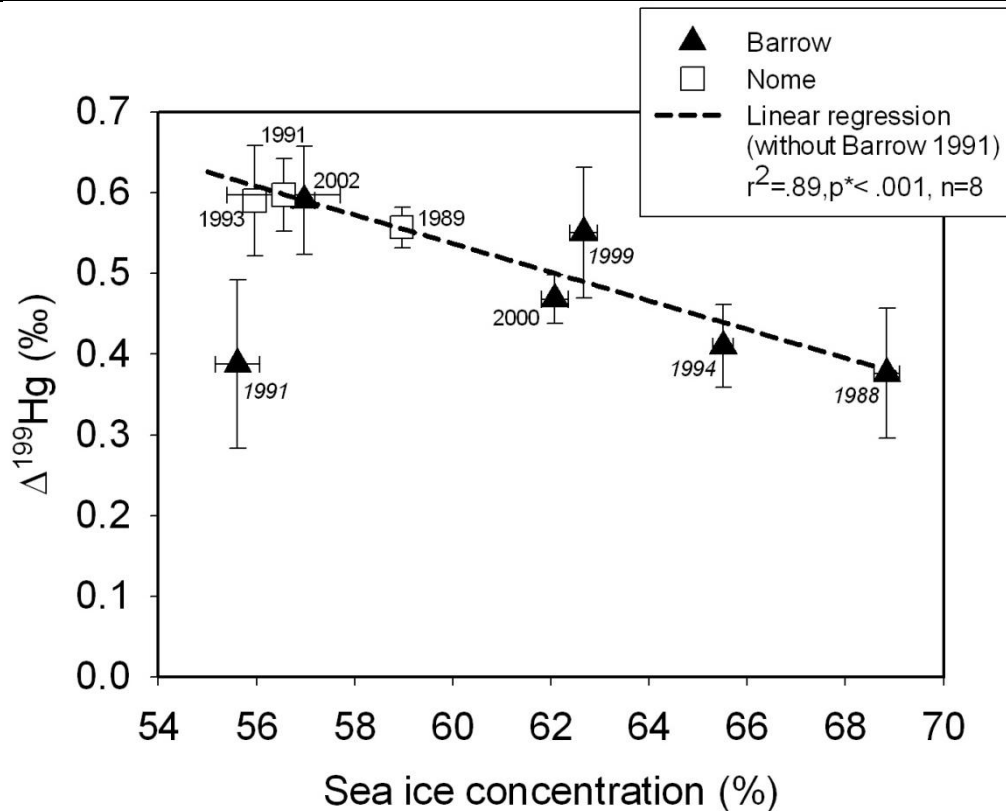


Figure 5: Temporal evolution of Hg MIF ($\Delta^{199}\text{Hg}$ (‰)), with PK weighted annual average sea ice concentration estimated for ringed seals samples from Barrow ($n=38$) and Nome ($n=11$). Details on sea ice concentrations calculations are provided in the ESI. Vertical and horizontal error bars correspond to the standard error based on $\Delta^{199}\text{Hg}$ and sea ice concentration geometric means calculated for each year. The dashed line represents the linear regression considering all years except samples collected in 1991 in Barrow (outlier values).

Despite the coherence between spatiotemporal $\Delta^{199}\text{Hg}$ variations in different biomonitor species (seabirds and ringed seals) and sea-ice cover, it remains a fact that the variability among ringed seal liver $\Delta^{199}\text{Hg}$ on an annual basis is significantly higher than the observed in seabird eggs. The opportunistic foraging behavior of ringed seals and the larger geographical extent of their habitat together with the longer MMHg turnover rates relative to seabird eggs that represent a MMHg time window of only a few weeks make this mammal species/liver tissue matrix combination a rather less sensitive and more difficult approach to detect time trends and geographical effects than seabird eggs. A combination of these factors may likely be at play to explain the outlier values observed for the individuals sampled in 1991 in Barrow (Figure 5). Three out of four ringed seal individuals collected 1991 at Barrow were adults, which also tend to show outlier values in a number of trends such as the HgT concentration as a function of sea ice cover (Figure S7). As adult seals show more limited migration ranges than juveniles (Crawford et al., 2012), and spend more time in the geographically low $\Delta^{199}\text{Hg}$ zone (Arctic Ocean) of their habitat, this may be at the origin of the observed bias,

although distinct $\delta^{13}\text{C}$ or $\delta^{15}\text{N}$ value were reported for 1991 (Figure S8). Instead, one may also consider indirect effects of sea-ice evolution on ringed seal ecology and Hg exposure.

In conclusion, the temporal Hg MIF trend determined in this work is consistent with the geographical Hg MIF gradient observed in murre eggs of the same region (Point et al., 2011), and suggests a significant spatio-temporal control of sea ice distribution and concentration on MMHg photochemistry in the Alaskan Arctic. Continued biomonitor Hg isotope analysis combined with an isotopic exploration of Arctic marine food webs, and both sediment and marine MMHg sources is essential to further understand Arctic MMHg dynamics and exposure.

Acknowledgements

This work is supported by research grants ANR-09-JCJC-0035-01 from the French Agence Nationale de Recherche and ERC-2010-StG_20091028 from the European Research Council to JES. JM acknowledges his PhD scholarship from the French Ministry of Higher Education and Research. G. Guillou is thanked for carrying out the carbon and nitrogen isotopic analyses.

Bibliography

- AMAP, 2011. AMAP Assessment 2011: Mercury in the Arctic. Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP). (Oslo, Norway. xiv): 193 pp.
- Ariya et al., 2004. The Arctic: a sink for mercury, 56. Blackwell, Oxford, Royaume-Uni, 7 pp.
- Atwell et al., 1998. Biomagnification and bioaccumulation of mercury in an arctic marine food web : insights from stable nitrogen isotope analysis, 55. National Research Council of Canada, Ottawa, ON, CANADA.
- Becker, P.R. et al., 2000. Concentrations of Polychlorinated Biphenyls (PCB's), Chlorinated Pesticides, and Heavy Metals and Other Elements in Tissues of Belugas, *Delphinapterus leucas*, from Cook Inlet. *Marine Fisheries Review*, 62(3): p. 81-98.
- Becker, P.R., Standards, N.I.o., Technology, 1991. Alaska Marine Mammal Tissue Archival Project: Revised Collection Protocol. U.S. Department of Commerce, National Institute of Standards and Technology.
- Bergquist, B.A., Blum, J.D., 2007. Mass-Dependent and -Independent Fractionation of Hg Isotopes by Photoreduction in Aquatic Systems. *Science*, 318(5849): 417-420.
- Bergquist, B.A., Blum, J.D., 2009. The Odds and Evens of Mercury Isotopes: Applications of Mass-Dependent and Mass-Independent Isotope Fractionation. *Elements*, 5(6): 353-357.
- Bernhard, G., 2011. Trends of solar ultraviolet irradiance at Barrow, Alaska, and the effect of measurement uncertainties on trend detection. *Atmos. Chem. Phys.*, 11(24): 13029-13045.
- Bignert, A., Riget, F., Braune, B., Outridge, P., Wilson, S., 2004. Recent temporal trend monitoring of mercury in Arctic biota - how powerful are the existing data sets? *Journal of Environmental Monitoring*, 6(4): 351-355.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 37(8): 911-7.

Chapitre 4. La tendance temporelle des compositions isotopiques du Hg chez les phoques annelés, reflet de la fonte de la couverture de glace en Alaska

- Bloom, N.S., 1992. On the chemical form of mercury in edible fish and marine invertebrate tissue. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49(5): 1010-1017.
- Blum, J.D., Popp, B.N., Drazen, J.C., Choy, C.A., Johnson, M.W., 2013. Methylmercury production below the mixed layer in the North Pacific Ocean. *Nature geoscience*, 6(10): 879-884.
- Crawford, J., Frost, K., Quakenbush, L., Whiting, A., 2012. Different habitat use strategies by subadult and adult ringed seals (*Phoca hispida*) in the Bering and Chukchi seas. *Polar Biology*, 35(2): 241-255.
- Das, R., Salters, V.J.M., Odom, A.L., 2009. A case for in vivo mass-independent fractionation of mercury isotopes in fish. *Geochem. Geophys. Geosyst.*, 10(11): Q11012.
- Dastoor, A.P., Durnford, D.A., 2013. Arctic Ocean: Is it a sink or a source of atmospheric mercury? *Environmental Science & Technology*.
- Day, R.D. et al., 2012. Mercury Stable Isotopes in Seabird Eggs Reflect a Gradient from Terrestrial Geogenic to Oceanic Mercury Reservoirs. *Environmental Science & Technology*, 46(10): 5327-5335.
- Dehn, L.-A. et al., 2006. Trophic relationships in an Arctic food web and implications for trace metal transfer. *Science of The Total Environment*, 362(1-3): 103-123.
- Dehn, L.-A. et al., 2007. Feeding ecology of phocid seals and some walrus in the Alaskan and Canadian Arctic as determined by stomach contents and stable isotope analysis. *Polar Biology*, 30(2): 167-181.
- Dietz, R., Outridge, P.M., Hobson, K.A., 2009. Anthropogenic contributions to mercury levels in present-day Arctic animals—A review. *Science of The Total Environment*, 407(24): 6120-6131.
- Eagles-Smith, C.A., Ackerman, J.T., Yee, J., Adelsbach, T.L., 2009. Mercury demethylation in waterbird livers: dose-response thresholds and differences among species. *Environ Toxicol Chem*, 28(3): 568-577.
- EUMETSAT, Ocean and Sea Ice Satellite Application Facility, Global sea ice concentration reprocessing dataset 1978-2009 (v1.1, 2011), [Online]. , Norwegian and Danish Meteorological Institutes. Available from <http://osisaf.met.no>.
- Gaden, A., Ferguson, S.H., Harwood, L., Melling, H., Stern, G.A., 2009. Mercury Trends in Ringed Seals (*Phoca hispida*) from the Western Canadian Arctic since 1973: Associations with Length of Ice-Free Season. *Environmental Science & Technology*, 43(10): 3646-3651.
- Harwood, L.A., Smith, T.G., Auld, J.C., 2012a. Fall Migration of Ringed Seals (*Phoca hispida*) through the Beaufort and Chukchi Seas, 2001-02. 2012, 65.
- Harwood, L.A., Smith, T.G., Auld, J.C., 2012b. Fall migration of ringed seals (*Phoca hispida*) through the Beaufort and Chukchi seas, 2001-02. *Arctic*, 65: 35-44.
- Hoekstra, P.F. et al., 2002. Trophic ecology of bowhead whales (*Balaena mysticetus*) compared with that of other arctic marine biota as interpreted from carbon-, nitrogen-, and sulfur-isotope signatures. *Canadian Journal of Zoology*, 80(2): 223-231.
- Jackson, T.A., Whittle, D.M., Evans, M.S., Muir, D.C.G., 2008. Evidence for mass-independent and mass-dependent fractionation of the stable isotopes of mercury by natural processes in aquatic ecosystems. *Applied Geochemistry*, 23(3): 547-571.
- Kelly, B. et al., 2010a. Seasonal home ranges and fidelity to breeding sites among ringed seals. *Polar Biology*, 33(8): 1095-1109.
- Kelly, B.P. et al., 2010b. Status Review of the Ringed Seal (*Phoca hispida*).
- Kritee, K., Barkay, T., Blum, J.D., 2009. Mass dependent stable isotope fractionation of mercury during mer mediated microbial degradation of monomethylmercury. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 73(5): 1285-1296.

Chapitre 4. La tendance temporelle des compositions isotopiques du Hg chez les phoques annelés, reflet de la fonte de la couverture de glace en Alaska

- Kwon, S.Y. et al., 2012. Absence of Fractionation of Mercury Isotopes during Trophic Transfer of Methylmercury to Freshwater Fish in Captivity. *Environmental Science & Technology*, 46(14): 7527-7534.
- Laffont, L. et al., 2009. Anomalous Mercury Isotopic Compositions of Fish and Human Hair in the Bolivian Amazon. *Environmental Science & Technology*, 43(23): 8985-8990.
- Lailson-Brito, J. et al., 2012. Mercury-Selenium Relationships in Liver of Guiana Dolphin: The Possible Role of Kupffer Cells in the Detoxification Process by Tiemannite Formation. *PLoS ONE*, 7(7): e42162.
- Monperrus, M., Rodriguez Martin-Doimeadios, R.C., Scancar, J., Amouroux, D., Donard, O.F.X., 2003. Simultaneous Sample Preparation and Species-Specific Isotope Dilution Mass Spectrometry Analysis of Monomethylmercury and Tributyltin in a Certified Oyster Tissue. *Analytical Chemistry*, 75(16): 4095-4102.
- Moore, S.E., Laidre, K.L., 2006. Trends in sea ice cover within habitats used by bowhead whales in the western Arctic. *Ecol Appl*, 16(3): 932-44.
- Nicholson, M.D., Fryer, R.J., Larsen, J.R., 1998. Temporal trend monitoring : robust method for analysing contaminant trend monitoring data. ICES techniques in marine environmental sciences;no. 20. ICES, Copenhagen.
- Outridge, P.M., Hobson, K.A., Savelle, J., 2009. Long-term changes of mercury levels in ringed seal (*Phoca hispida*) from Amundsen Gulf, and beluga (*Delphinapterus leucas*) from the Beaufort Sea, western Canadian Arctic. *Science of The Total Environment*, 407(23): 6044-6051.
- Outridge, P.M., Macdonald, R.W., Wang, F., Stern, G.A., Dastoor, A.P., 2008. A mass balance inventory of mercury in the Arctic Ocean. *Environmental Chemistry*, 5(2): 89-111.
- Perrot, V. et al., 2010. Tracing Sources and Bioaccumulation of Mercury in Fish of Lake Baikal–Angara River Using Hg Isotopic Composition. *Environmental Science & Technology*, 44(21): 8030-8037.
- Perrot, V., Pastukhov, M.V., Epov, V.N., Amouroux, D., 2012. Hg Stables Isotopes Assessing Methylmercury Bioaccumulation, Sources, and Metabolization in the Pelagic Food Web of Lake Baikal (Russia). *Mineralogical Magazine*, 22nd annual V.M. Goldschmidt Conference, Montreal, Canada, June 24-29 (2012).
- Point, D. et al., 2011. Methylmercury photodegradation influenced by sea-ice cover in Arctic marine ecosystems. *Nature Geosci*, 4(3): 188-194.
- Rigét, F. et al., 2011. Temporal trends of Hg in Arctic biota, an update. *Science of The Total Environment*, 409(18): 3520-3526.
- Riget, F., Dietz, R., Hobson, K.A., 2012. Temporal trends of mercury in Greenland ringed seal populations in a warming climate. *Journal of Environmental Monitoring*, 14(12): 3249-3256.
- Riget, F. et al., 2005. Circumpolar pattern of mercury and cadmium in ringed seals. *Science of The Total Environment*, 351–352(0): 312-322.
- Riget, F., Vorkamp, K., Dietz, R., Rastogi, S.C., 2006. Temporal trend studies on polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in ringed seals from East Greenland. *Journal of Environmental Monitoring*, 8(10): 1000-1005.
- Rigor, I.G., Wallace, J.M., 2004. Variations in the age of Arctic sea-ice and summer sea-ice extent. *Geophysical Research Letters*, 31(9): L09401.
- Schell, D.M., Barnett, B.A., Vnette, K.A., 1998. Carbon and nitrogen isotope ratios in zooplankton of the Bering, Chukchi and Beaufort seas. *Marine Ecology Progress Series*, 162(12): 11-23.
- Smith, T.G., Armstrong, F.A.J., 1978. Mercury and Selenium in Ringed and Bearded Seal Tissues From Arctic Canada. 1978, 31.

Chapitre 4. La tendance temporelle des compositions isotopiques du Hg chez les phoques annelés, reflet de la fonte de la couverture de glace en Alaska

- Smith, T.G., Hammill, M.O., 1981. Ecology of the ringed seal, *Phoca hispida*, in its fast ice breeding habitat. *Canadian Journal of Zoology*, 59(6): 966-981.
- Smith, W.H., Sandwell, D.T., 1997. Global sea floor topography from satellite altimetry and ship depth soundings. *Science*, 277(5334): 1956-1962.
- Sonke, J.E., 2011. A global model of mass independent mercury stable isotope fractionation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75(16): 4577-4590.
- Steffen, A., Schroeder, W., Macdonald, R., Poissant, L., Konoplev, A., 2005. Mercury in the Arctic atmosphere: An analysis of eight years of measurements of GEM at Alert (Canada) and a comparison with observations at Amderma (Russia) and Kuujjuarapik (Canada). *Science of The Total Environment*, 342(1-3): 185-198.
- Stern, G.A. et al., 2012. How does climate change influence arctic mercury? *Science of The Total Environment*, 414(0): 22-42.
- Stroeve, J. et al., 2012. The Arctic's rapidly shrinking sea ice cover: a research synthesis. *Climatic Change*, 110(3-4): 1005-1027.
- Tillander, M., Miettinen, J.K., Koivisto, I., 1970. Excretion rate of methyl mercury in the seal (*Pusa Hispida*). Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Van Oostdam, J. et al., 2005. Human health implications of environmental contaminants in Arctic Canada: A review. *Science of The Total Environment*, 351-352(0): 165-246.
- Wagemann, R., Innes, S., Richard, P.R., 1996. Overview and regional and temporal differences of heavy metals in Arctic whales and ringed seals in the Canadian Arctic. *Science of The Total Environment*, 186(1-2): 41-66.
- Wagemann, R., Trebacz, E., Boila, G., Lockhart, W.L., 2000. Mercury species in the liver of ringed seals. *Science of The Total Environment*, 261(1-3): 21-32.
- Wilson, S., 2007. Workshop on Statistical Analysis of Temporal Trends of Mercury in Arctic Biota. AMAP Report Vol. 3.
- Yin, R., Feng, X., Shi, W., 2010. Application of the stable-isotope system to the study of sources and fate of Hg in the environment: A review. *Applied Geochemistry*, 25(10): 1467-1477.
- Zeisler, R. et al., 1993. Determination of inorganic constituents in marine mammal tissues. *Science of The Total Environment*, 139: 365-386.
- Zheng, W., Hintelmann, H., 2009. Mercury isotope fractionation during photoreduction in natural water is controlled by its Hg/DOC ratio. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 73(22): 6704-6715.

Supporting Information:

Hg stable isotope time trend in ringed seal registers decreasing sea ice cover in the Alaskan Arctic

Jérémy Masbou^{*1}, David Point¹, Jeroen E. Sonke¹, Frédéric Frappart¹, Vincent Perrot²,

David Amouroux², Pierre Richard³, Paul R. Becker⁴

¹Observatoire Midi-Pyrénées, Laboratoire Géosciences Environnement Toulouse, CNRS/IRD/Université Paul Sabatier Toulouse 3, 14 avenue Edouard Belin, 31400 Toulouse, France.

²Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement, Institut Pluridisciplinaire de Recherche sur l'Environnement et les Matériaux, CNRS-UPPA-UMR-5254, Hélioparc, 2 Avenue du Président Pierre Angot, Pau, 64053, France.

³UMR Littoral, Environnement et Sociétés (LIENSs), UMR 7266 CNRS-Université de La Rochelle, Institut du Littoral et de l'Environnement, 2 rue Olympe de Gouges, 17000 La Rochelle, France.

⁴National Institute of Standards and Technology, Analytical Chemistry Division, Hollings Marine Laboratory, 331 Fort Johnson Road, Charleston, South Carolina 29412 USA.

RECEIVED DATE

*Author for correspondence: jeremy.masbou@get.obs-mip.fr

Phone: +33 (0)5 61 33 26 07

Hg total concentration (HgT) measurements

HgT concentration measurements were performed on fresh frozen liver samples by atomic absorption after combustion and gold-trapping using a Milestone DMA-80 system at UMR GET. Calibration curves were prepared using NIST SRM 1947 and NRC DORM-2 for low and high Hg concentrations respectively. Triplicate measurements were performed for each individual sample. Measurements accuracy was tested using three different reference materials; NIST SRM 1947, NRC DORM2 and QC03LH03 that were analysed every 8-10 samples. Measurements accuracy is illustrated in Table 1.

Table S1: Results of the Hg total concentration for three reference material

Reference material	Measured (ng.g ⁻¹)			Certified (ng.g ⁻¹)	
	n	HgT	SD	HgT	U (95%CI)
NRC DORM-2	11	4805	158	4640	260
NIST SRM 1947	10	279	29	254	5
NIST QC03LH03	12	3788	217	3540 ^a	335

^a Consensus mean obtained by (Christopher et al., 2007)

Hg speciation measurements

Liver samples were analyzed by gas chromatography with ICPMS detection (GC-ICPMS) at the IPREM-LCABIE laboratory (Pau, France) to determine MMHg concentrations were determined using the isotope dilution technique developed by (Monperrus et al., 2003). Accuracy tests were achieved using NCR DOLT-4 reference material, certified for methyl Hg concentrations. Accuracy of measurements is illustrated in Table 2.

Table S2: Results of the Hg speciation for NRC DOLT-4 reference material

	Reference material	Batch N°	n	MMHg	SD	iHg	SD	HgT	SD
Measured (ng.g⁻¹)	NRC DOLT-4	1	3	1355	66	1185	36	2626	42
		2	3	1390	23	1200	31	2555	29
		3	3	1441	196	1232	96	2622	199
Certified (ng.g⁻¹)	NRC DOLT-4			1330	120*			2580	220

*U, 95%CI

Light stable isotopes $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$

Samples have been treated before analysis for lipid removal. This pre-treatment has been performed for a better $\delta^{13}\text{C}$ interpretation following (Becker et al., 2007). 150 mg of wet samples were freeze-dried at 0.065 mbar and -50°C during one night. Powders are then defatted using the chloroform/methanol (2:1) method (Bligh and Dyer, 1959). Finally, an aliquot of each sample was taken, weighed, and loaded into tin capsules for analysis.

Hg isotope analysis

Sample preparation

Approximately 0.2 g of fresh frozen liver sample was weighed into a pyrex microwave digestion vessel, and 5 mL of bi-distilled 15N nitric acid was added. Vessels were sealed with Teflon caps. Sample digestion was done in a CEM Discover microwave (180°C , 150 PSI, 10 min). Addition of BrCl ($100\mu\text{L}$, 0.2 mol.L^{-1}) for complete extraction did not make any recovery differences. To avoid a supplementary step, we decided not to add BrCl. The mixtures were finally diluted in inverse aqua regia (3 HNO_3 : 1 HCl, 20 vol.%) for Hg isotope analysis. Final concentrations range from 1-5 ng.g^{-1} . NIST Pigmy Sperm Whale Liver Homogenate Control Material QC03LH03 has been prepared in the same way.

Chapitre 4. La tendance temporelle des compositions isotopiques du Hg chez les phoques annelés, reflet de la fonte de la couverture de glace en Alaska

CV-MC-ICPMS measurements

^{198}Hg , ^{199}Hg , ^{200}Hg , ^{201}Hg and ^{202}Hg stable isotopes have been quantified using a Multi Collector-Inductively Coupled plasma Mass Spectrometer (MC-ICPMS, Thermo Finnigan Neptune) coupled with a cold vapor generator (CETAC HGX-200). Results of reference materials are summarized in Table 3.

Table S3: Results of Hg isotopic composition measurements for intercomparison standard UM-Almaden and Whale liver Control Material

Reference Material		n	$\delta^{199}\text{Hg}$ (‰)	$\delta^{200}\text{Hg}$ (‰)	$\delta^{201}\text{Hg}$ (‰)	$\delta^{202}\text{Hg}$ (‰)	$\Delta^{199}\text{Hg}$ (‰)	$\Delta^{200}\text{Hg}$ (‰)	$\Delta^{201}\text{Hg}$ (‰)
Intercomparison Hg Standard (UM-Almaden)	This work	46	-0.16 ± 0.06	-0.26 ± 0.07	-0.44 ± 0.09	-0.53 ± 0.10	-0.03 ± 0.05	0.01 ± 0.05	-0.04 ± 0.06
	(Bergquist and Blum, 2007)	22-25	-0.14 ± 0.06	-0.27 ± 0.04	-0.44 ± 0.07	-0.54 ± 0.08	-0.01 ± 0.02	0.00 ± 0.02	-0.04 ± 0.04
QC03LH03 Pygmy Sperm Whale Liver Homogenate Control Material	This work	31	0.97 ± 0.10	-0.33 ± 0.07	0.35 ± 0.12	-0.78 ± 0.14	1.16 ± 0.10	0.06 ± 0.04	0.94 ± 0.10
	5 ng/g	21	0.98 ± 0.10	-0.34 ± 0.06	0.35 ± 0.10	-0.80 ± 0.11	1.18 ± 0.11	0.06 ± 0.03	0.95 ± 0.10
	2.5 ng/g	5	0.93 ± 0.08	-0.33 ± 0.06	0.32 ± 0.15	-0.77 ± 0.11	1.13 ± 0.06	0.06 ± 0.06	0.90 ± 0.10
	1 ng/g	5	0.97 <i>0.10</i>	-0.29 <i>0.06</i>	0.40 <i>0.16</i>	-0.70 <i>0.18</i>	1.15 <i>0.08</i>	0.06 <i>0.06</i>	0.93 <i>0.07</i>

Chapitre 4. La tendance temporelle des compositions isotopiques du Hg chez les phoques annelés, reflet de la fonte de la couverture de glace en Alaska

Location	Animal ID.	Year	Sex	Age	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	HgT	SD	iHg	SD	MMHg	SD	n	$\delta^{199}\text{Hg}$	2SD	$\delta^{200}\text{Hg}$	2SD	$\delta^{201}\text{Hg}$	2SD	$\delta^{202}\text{Hg}$	2SD	$\Delta^{199}\text{Hg}$	2SD	$\Delta^{200}\text{Hg}$	2SD	$\Delta^{201}\text{Hg}$	2SD
				(y)	(‰)	(‰)	($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		(‰)	(‰)	(‰)	(‰)	(‰)	(‰)	(‰)	(‰)	(‰)	(‰)	(‰)	(‰)	(‰)	(‰)
	MM19L418C	2002	M	0.5	-18.24	16.54	0.11	0.01					1	0.50	0.10	0.21	0.07	0.57	0.12	0.40	0.14	0.40	0.10	0.01	0.04	0.27	0.10
	MM19L420C	2002	F	0.5	-18.12	16.28	0.41	0.01					4	0.80	0.10	0.11	0.04	0.82	0.17	0.23	0.05	0.74	0.10	-0.01	0.04	0.65	0.17
	MM19L424C	2002	F	17	-17.94	16.57	1.42	0.03	1.27	0.02	0.15	0.01	2	0.45	0.10	-0.01	0.07	0.33	0.12	-0.05	0.14	0.46	0.10	0.01		0.37	0.10
	MM19L430C	2002	M	7	-17.94	16.32	0.50	0.02					3	0.37	0.07	-0.17	0.11	0.08	0.08	-0.35	0.13	0.46	0.08	0.01	0.09	0.34	0.07
	MM19L434C	2002	M	11	-17.49	17.56	4.50	0.14	4.36	0.12	0.14	0.03	2	0.46	0.10	-0.21	0.07	0.21	0.12	-0.37	0.14	0.56	0.10	-0.03	0.04	0.48	0.10
	MM19L436C	2002	F	8	-18.15	17.46	3.67	0.29					1	0.57	0.10	-0.11	0.07	0.34	0.12	-0.21	0.14	0.62	0.10	0.00	0.04	0.50	0.10
Nome	MM03L054	1989	M	1	-18.55	19.46	2.50	0.10					1	0.57	0.10	0.06	0.07	0.52	0.12	0.12	0.14	0.54	0.10	0.00	0.04	0.43	0.10
	MM03L057	1989	F	2	-19.25	18.70	4.73	0.16					2	0.44	0.10	-0.10	0.07	0.25	0.12	-0.19	0.14	0.49	0.10	-0.01	0.04	0.39	0.10
	MM03L060	1989	M	1	-18.38	19.50	1.55	0.17					3	0.56	0.06	-0.04	0.05	0.40	0.15	-0.14	0.10	0.60	0.03	0.03	0.01	0.51	0.08
	MM03L063	1989	M	1	-18.59	18.63	3.56	0.07					2	0.42	0.10	-0.19	0.07	0.03	0.12	-0.43	0.14	0.53	0.10	0.03	0.04	0.35	0.10
	MM03L066	1989	F	1	-18.55	18.42	0.62	0.01					3	0.64	0.07	0.05	0.04	0.60	0.17	0.04	0.10	0.63	0.04	0.03	0.03	0.57	0.09
	MM05L155	1991	M	1	-19.53	21.53	0.62	0.10					3	0.54	0.09	-0.13	0.14	0.35	0.13	-0.28	0.10	0.61	0.09	0.01	0.10	0.56	0.16
	MM05L158	1991	F	-	-19.27	18.87	0.58	0.01					3	0.51	0.04	0.10	0.03	0.53	0.06	0.17	0.10	0.46	0.02	0.01	0.03	0.40	0.12
	MM05L161	1991	F	1	-19.10	18.55	0.54	0.03					3	0.77	0.07	0.16	0.06	0.73	0.12	0.26	0.13	0.70	0.04	0.02	0.02	0.53	0.12
	MM07L226	1993	M	1.5	-18.33	17.63	0.77	0.05					3	0.77	0.05	0.06	0.10	0.79	0.14	0.14	0.05	-0.73	0.04	-0.01	0.10	0.68	0.11
	MM07L229	1993	M	-	-19.64	19.07	0.26	0.03					1	0.63	0.10	0.27	0.07	0.66	0.12	-0.30	0.14	0.56	0.10	0.11	0.04	0.44	0.10
	MM07L232	1993	M	1.5	-18.20	17.37	4.21	0.12					2	0.47	0.10	-0.16	0.07	0.20	0.12	-0.31	0.14	0.55	0.10	0.00	0.04	0.43	0.10
	MM07L247	1993	M	1	-19.16	18.82	0.17	0.00					1	0.62	0.10	0.26	0.07	0.78	0.12	0.30	0.14	0.55	0.10	0.11	0.04	0.55	0.10
	MM11L410	1996	M	1.75	-17.83	19.39	0.77	0.05					3	0.50	0.04	-0.03	0.14	0.44	0.07	-0.06	0.15	0.52	0.01	0.00	0.08	0.48	0.05
	MM12L623	1997	F	-	-17.74	18.17	1.58	0.03					1	0.60	0.10	0.04	0.07	0.51	0.12	0.08	0.14	0.58	0.10	0.00	0.04	0.45	0.10

Chapitre 4. La tendance temporelle des compositions isotopiques du Hg chez les phoques annelés, reflet de la fonte de la couverture de glace en Alaska

Table S5 : Comparison with literature (Riget et al., 2005) of Hg total concentrations in ringed seal livers

Location	Year	Age (Year)	n	HgT ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	SD ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Ref
Sachs Harbour, Canada	2001	0-5	15	19.20	23.26	
Sachs Harbour, Canada	2001	≥ 6	5	19.10	9.6	
Holman, Canada	2001	0-5	2	19.60	10	
Holman, Canada	2001	≥ 6	18	29.90	26.5	
Arctic Bay, Canada	2000	0-5	5	7.42	7.11	
Arctic Bay, Canada	2000	≥ 6	17	12.40	14.4	
Grise Fiord, Canada	1998	0-5	2	19.60	10	
Grise Fiord, Canada	1998	≥ 6	18	29.90	26.5	
Pont Inlet, Canada	2000	0-5	16	6.84	16.9	
Pont Inlet, Canada	2000	≥ 6	7	14.90	9.8	
Avanersuaq, Greenland	1998	0-5	12	4.59	4.2	(Riget et al., 2005)
Avanersuaq, Greenland	1998	≥ 6	8	9.15	6.58	
Qeqertarsuaq, Greenland	1999-2000	0-5	32	1.23	2.66	
Qeqertarsuaq, Greenland	1999-2000	≥ 6	3	2.91	2.03	
Ittoqqortoormiit, Greenland	1999-2000	0-5	24	4.78	4.35	
Ittoqqortoormiit, Greenland	1999-2000	≥ 6	14	7.96	5.08	
Svalbard, Norway	1996	0-5	7	0.64	0.317	
Svalbard, Norway	1996	≥ 6	10	1.19	0.74	
White Sea, Russia	2001	0-5	8	1.87	1.44	
White Sea, Russia	2001	≥ 6	11	2.41	2.78	
Barrow, Alaska	1995-1997	0-5	5	0.73	0.653	
Barrow, Alaska	1995-1997	≥ 6	11	4.78	5.72	
Nome, Alaska	1989-1997	0-5	11	1.82	1.65	
Barrow, Alaska	1988-2002	0-5	18	1.24	2.00	This study
Barrow, Alaska	1991-2002	≥ 5	20	4.90	4.23	

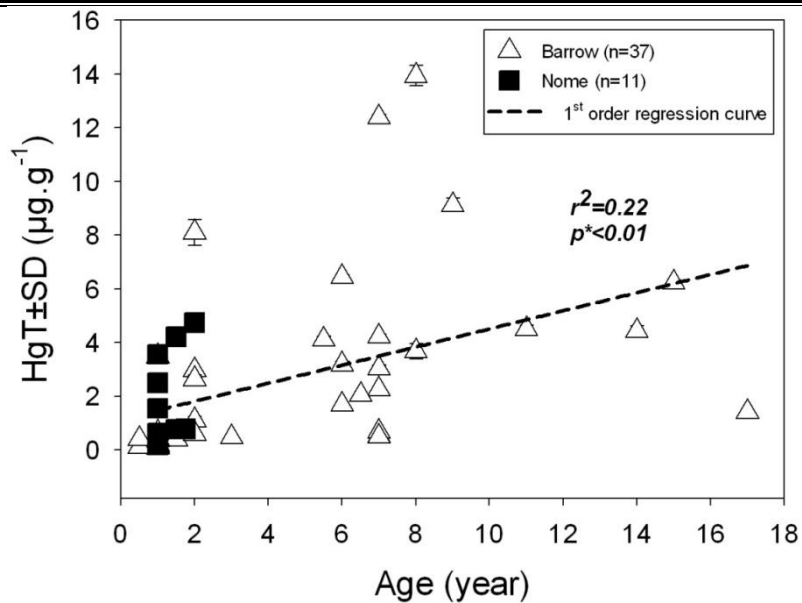


Figure S1: Evolution of total Hg concentration with the age of ringed seals. Black squares represent individuals sampled in Nome and white triangles are individuals sampled in Barrow. The dotted line represents the linear regression curve of samples collected in Barrow ($r^2=0.22$, $p^*<0.01$, $n=38$).

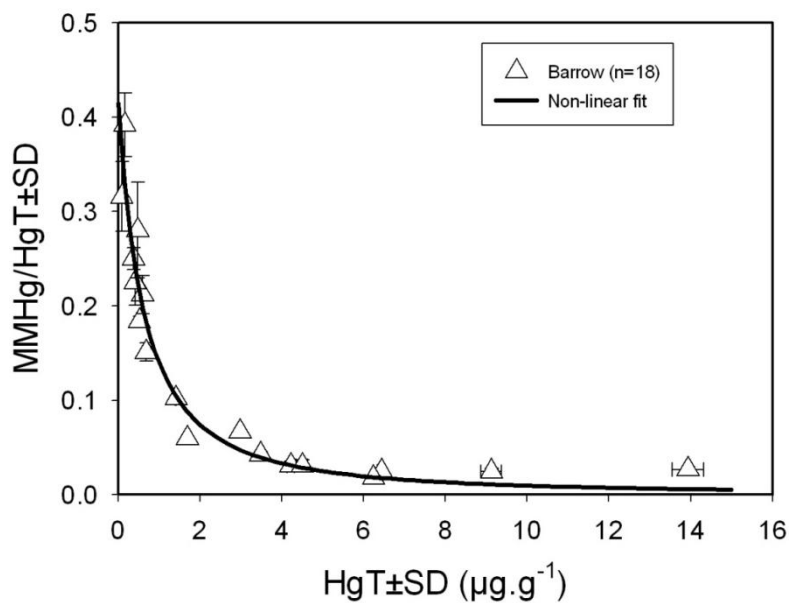


Figure S2: Evolution of the fraction of MMHg/HgT ratio with HgT concentration of ringed seals. Best non-linear fit ($r^2=0.94$, $p^*<0.0001$) has been determined using DataFit® software developed by Oakdale Engineering (PA, USA). Equation is: $y = 0.4146 \times (1 - x)^{-1.565}$

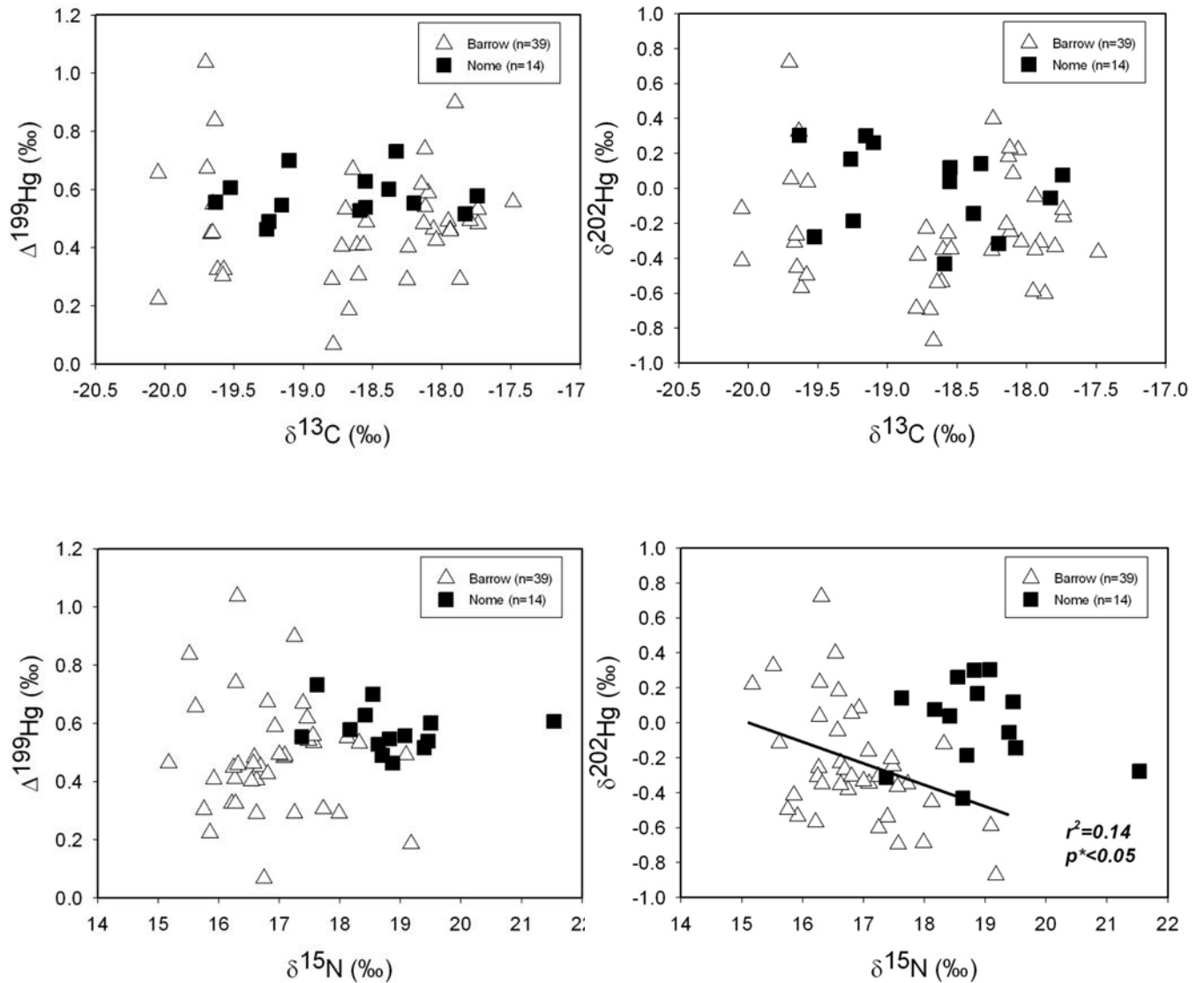


Figure S3: $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ vs. Hg MDF ($\delta^{202}\text{Hg}$, bottom) and Hg MIF ($\Delta^{199}\text{Hg}$, top) signatures. Black squares and open triangles represent ringed seal livers from Nome and Barrow respectively.

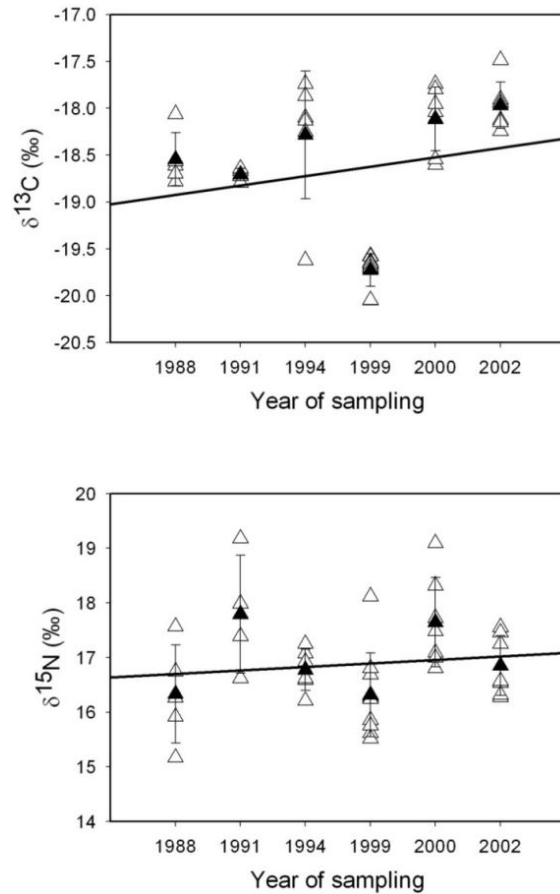


Figure S4: Temporal variation of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in Barrow ringed seal livers (white triangles) during the period 1988-2002. Annual geometric means are shown as black triangles and error bars represent 95% confidence intervals around means. The data series show no significant log-linear trend.

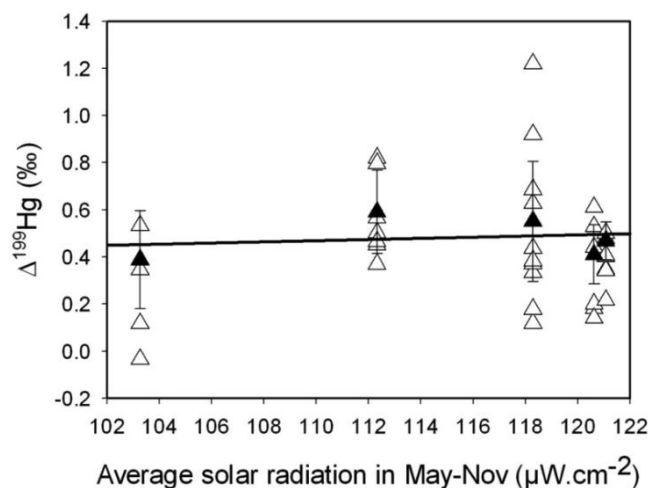


Fig S5: Hg MIF signatures ($\Delta^{199}\text{Hg}$) in Barrow as a function of solar radiation data (average May-Nov). Same symbols as Figure S4. Solar radiation data comes from (Bernhard, 2011). The data series show no significant trend.

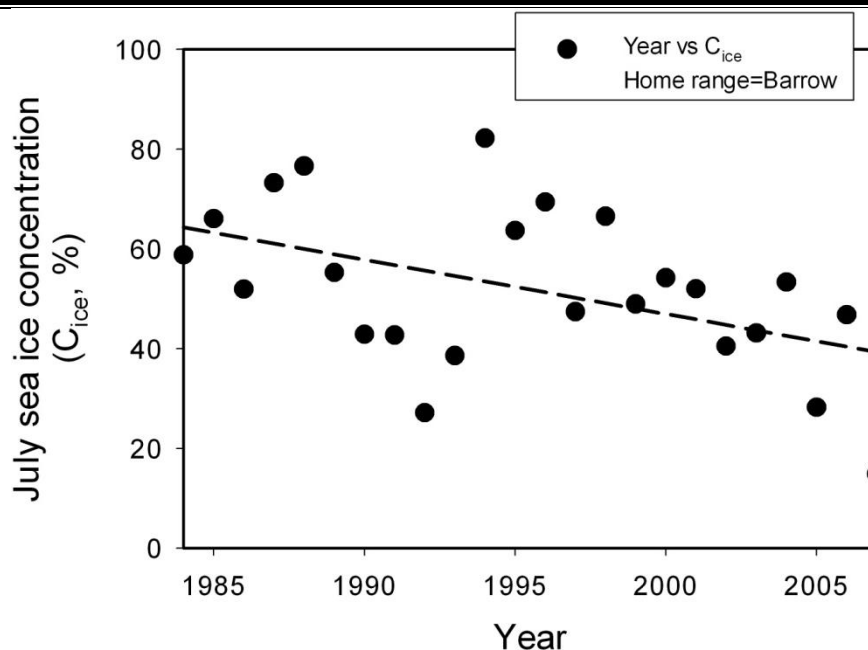


Figure S6: Year vs average sea ice concentrations integrated in July for Barrow seals home range area (Figure 1).

Hg speciation and turnover time in liver

In order to interpret time trends of HgT or Hg isotope signatures in liver tissue, in terms of climatic or ecological control factors, one needs to consider the period of Hg exposure that is represented by Hg in liver tissue. Few studies address the different Hg species in liver tissue and their respective turnover rates. Wageman et al. (2000) have operationally extracted and quantified methylmercury (MMHg, mean 2%), organic mercury other than MMHg (org-Hg, mean 4%), labile inorganic mercury (iHg, mean 42%) and insoluble mercury selenide (HgSe, mean 53%) compounds in 45 ringed seal livers from the Canadian Arctic (Wagemann et al., 2000). As marine mammal inorganic Hg exposure is considered low, the inorganic Hg species in liver are thought to be mainly derived from the in vivo breakdown of MMHg (Eagles-Smith et al., 2009; Smith and Armstrong, 1978). The four Hg species in liver should exhibit different biochemical reactivity and turnover rates within liver tissue. We consider that MMHg, org-Hg and labile iHg are all likely bound to S-containing amino acids (within proteins or small molecular weight organic compounds) and have turn-over times that are dictated by the short-term stability of amino acids and/or proteins. Contrarily, the transformation of labile protein-bound iHg to insoluble HgSe compounds that are poorly excreted should lead to longer half-lives in liver tissue on the order of years. A second study by Tillander et al. (1970) informs on the half-life of different Hg species in seals (Tillander et al., 1970). The authors applied a small dietary bolus dose of radioactive MM²⁰³Hg tracer to a seal in captivity and traced the whole body radioactivity over a period of 5 months. The investigation showed that about 45% of the MM²⁰³Hg administered

Chapitre 4. La tendance temporelle des compositions isotopiques du Hg chez les phoques annelés, reflet de la fonte de la couverture de glace en Alaska

was excreted with a long biological half-time of 500 days. Most MM²⁰³Hg was excreted rapidly with a half-time of 20 days. Based on the Tillander et al. (1970) study we assume that the short, 20 day, half-life is representative of labile Hg forms in seals and seal liver, and that the long, 500-day, half-life is representative of the insoluble HgSe species in seal and seal liver.

With the estimates of liver HgSe fraction (53% of the our measured iHg fraction) and half-lives of insoluble HgSe (500 days), and labile MMHg+iHg (20 days) at hand, we then calculated for each seal individual of known age the fraction of MMHg exposure that corresponds to each day of its life, and that is still present as part of HgT in the seal's liver. This provides a weighting scheme that we then applied to daily satellite-based estimates of the sea ice concentration in the seal's foraging territory. In other words, we estimated the weighted averaged open water fraction that a given seal, with a given $\Delta^{199}\text{Hg}$, has encountered in its foraging area during its lifetime. Most of the weight in this model is on the MMHg exposure and open water fraction during the last 20 days preceding capture, followed by MMHg exposure during the previous summer season (within 500 days half-time, and with maximum values of C).

Chapitre 4. La tendance temporelle des compositions isotopiques du Hg chez les phoques annelés, reflet de la fonte de la couverture de glace en Alaska

Table S6: Sea ice cover concentration and fraction of open water data determined from the PK model for each ringed seal sample, and determined with extended Hg speciation and age consideration (previously detailed).

NBSB ID NO.	Sea ice concentration (%)	NBSB ID NO.	Sea ice concentration (%)
MM02L024	69.69	MM17L266C	61.83
MM02L048	68.21	MM17L268C	61.82
MM02L030	68.75	MM17L282C	61.78
MM02L042	68.43	MM17L285C	62.52
MM02L045	69.14	MM17L290C	61.43
MM05L170	56.03	MM19L416C	57.26
MM05L179	56.60	MM19L418C	56.71
MM05L185	55.30	MM19L420C	56.98
MM05L194	54.52	MM19L424C	56.87
MM09L307	65.86	MM19L430C	56.02
MM09L310	65.98	MM19L434C	57.99
MM09L313	65.02	MM19L436C	56.95
MM09L316	65.79	MM03L054	59.04
MM09L319	65.68	MM03L057	59.00
MM09L322	64.74	MM03L060	58.89
MM15L089C	63.03	MM03L063	58.80
MM15L091C	63.54	MM03L066	59.07
MM15L093C	63.50	MM05L155	55.91
MM15L095C	62.84	MM05L158	No Age
MM15L097	62.90	MM05L161	56.01
MM15L099C	62.19	MM05L226	58.13
MM15L101C	62.32	MM07L229	No Age
MM15L103C	62.88	MM07L232	57.22
MM15L105C	No Age	MM07L247	54.30
MM15L107C	60.81	MM11L410	57.45
MM17L261C	63.53	MM12L623	No Age
MM17L264C	61.65		

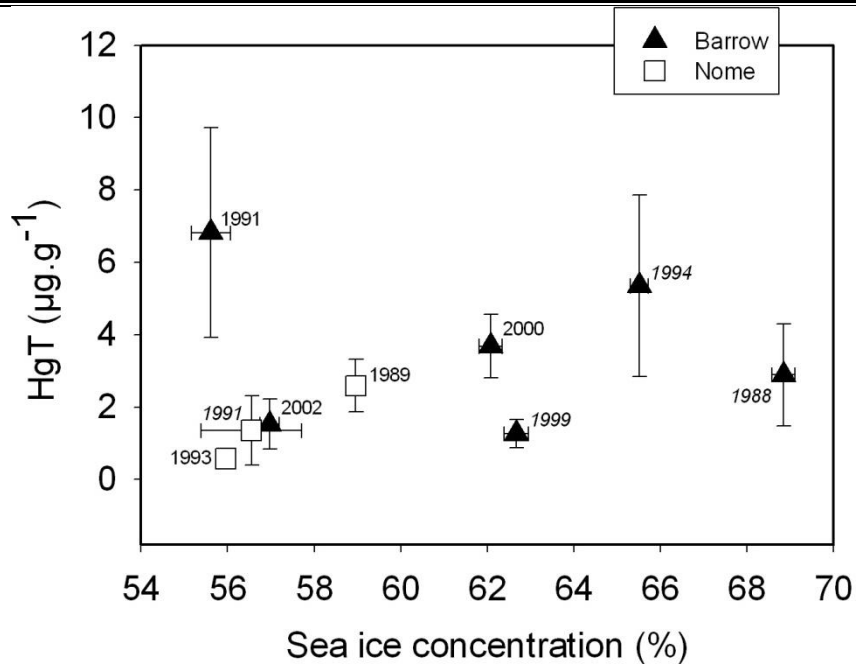


Figure S7: Temporal evolution of HgT concentration with the sea ice concentration for the samples grouped according to their location and sampling year. Vertical error bars correspond to the standard error based on geometric means calculated in each year of sampling. No significant linear trends have been detected between the two parameters ($r^2=0.03$, $p=0.67$, $n=9$).

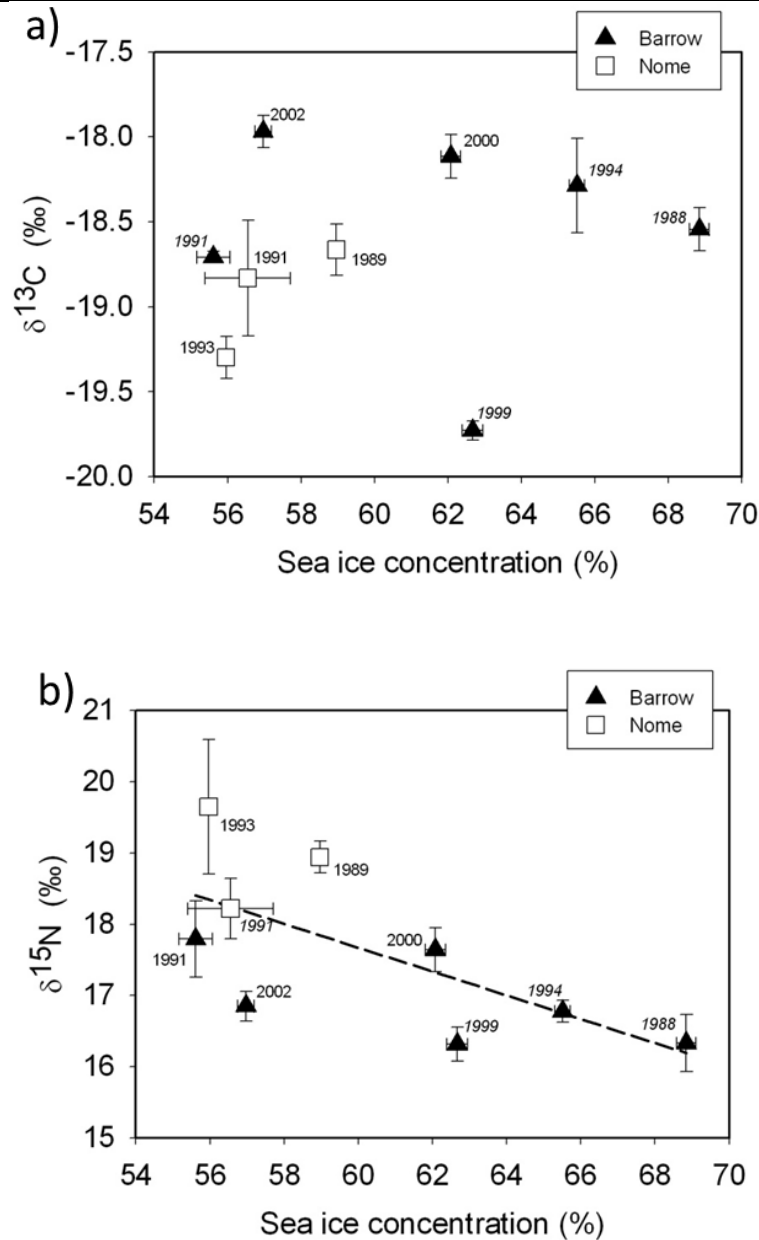


Figure S8: Temporal evolution of a) $\delta^{13}\text{C}$ and b) $\delta^{15}\text{N}$ with the sea ice concentration for the samples grouped according to their location and sampling year. Vertical error bars correspond to the standard error based on geometric means calculated in each year of sampling. Linear trend analysis results are: a) $r^2=0.02$, $p=0.74$, $n=9$, b) $r^2=0.45$, $p^*<0.05$, $n=9$.

Bibliography

- Becker, B.H., Newman, S.H., Inglis, S., Beissinger, S.R., 2007. Diet-feather stable isotope ($\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$) fractionation in Common murrelets and other seabirds. *The Condor*, 109(2): 451-456.
- Bergquist, B.A., Blum, J.D., 2007. Mass-Dependent and -Independent Fractionation of Hg Isotopes by Photoreduction in Aquatic Systems. *Science*, 318(5849): 417-420.
- Bernhard, G., 2011. Trends of solar ultraviolet irradiance at Barrow, Alaska, and the effect of measurement uncertainties on trend detection. *Atmos. Chem. Phys.*, 11(24): 13029-13045.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 37(8): 911-7.
- Christopher, S. et al., 2007. Description and results of the NIST/NOAA 2005 Interlaboratory Comparison Exercise for Trace Elements in Marine Mammals. *Accreditation and Quality Assurance*, 12(3-4): 175-187.
- Eagles-Smith, C.A., Ackerman, J.T., Yee, J., Adelsbach, T.L., 2009. Mercury demethylation in waterbird livers: dose-response thresholds and differences among species. *Environ Toxicol Chem*, 28(3): 568-577.
- Monperrus, M., Rodriguez Martin-Doimeadios, R.C., Scancar, J., Amouroux, D., Donard, O.F.X., 2003. Simultaneous Sample Preparation and Species-Specific Isotope Dilution Mass Spectrometry Analysis of Methylmercury and Tributyltin in a Certified Oyster Tissue. *Analytical Chemistry*, 75(16): 4095-4102.
- Riget, F. et al., 2005. Circumpolar pattern of mercury and cadmium in ringed seals. *Science of The Total Environment*, 351-352(0): 312-322.
- Smith, T.G., Armstrong, F.A.J., 1978. Mercury and Selenium in Ringed and Bearded Seal Tissues From Arctic Canada. 1978, 31.
- Tillander, M., Miettinen, J.K., Koivisto, I., 1970. Excretion rate of methyl mercury in the seal (*Pusa hispida*). Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Wagemann, R., Trebacz, E., Boila, G., Lockhart, W.L., 2000. Mercury species in the liver of ringed seals. *Science of The Total Environment*, 261(1-3): 21-32.

Chapitre 5.

Variation des signatures isotopiques en Hg dans les foies de mammifères marins de l'Alaska

Chapitre 5. Variation des signatures isotopiques en Hg dans les foies de mammifères marins de l'Alaska

Résumé

Les récents travaux de notre groupe sur les isotopes stables du Hg mesurés dans les œufs de guillemots (*Uria lomvia* et *Uria aalge*) et les foies de phoques annelés d'Alaska (*Pusa hispida*, Chapitre 4) ont montrés la vraisemblable influence de la couverture de glace sur le cycle du Hg. Dans cette étude, des tissus complémentaires de mammifères marins provenant du NIST National Biomonitoring Specimen Bank ont été analysés pour documenter les variations isotopiques de la faune Arctique à plus large échelle. Les signatures isotopiques du Hg ont été déterminées sur les échantillons de foies de 55 baleines beluga (*Delphinapterus leucas*) et de 15 ours polaires (*Ursus maritimus*) entre 1989 et 2002.

Les variations inter et intra-espèces indiquent une variabilité de $\delta^{202}\text{Hg}$ d'environ 2.1‰ et pour $\Delta^{199}\text{Hg}$ de l'ordre de 1.7‰. La comparaison des signatures isotopiques du Hg chez les ours polaires par rapport à celles obtenues chez les phoques annelés, suggère l'absence de fractionnement indépendant de la masse (MIF) lors de l'étape de transfert trophique. Seul un enrichissement significatif en isotopes lourds en $\delta^{202}\text{Hg}$ de l'ordre de $0.33 \pm 0.11\%$ (SE) a pu être mis en évidence.

La mise en relation des mesures isotopiques du Hg avec les paramètres métaboliques (spéciation du Hg) et écologiques ($\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$), permet de mettre en relation l'habitat intégré par les mammifères étudiés à des signatures isotopiques de Hg spécifiques. Les différents stocks de beluga possèdent ainsi chacun une signature combinée Hg MDF/MIF unique, ce qui indique que les habitats qu'ils intègrent, disposent probablement de signature isotopiques en Hg différentes.

Les valeurs d'anomalies en $\Delta^{199}\text{Hg}$ montrent un fort gradient latitudinal nord-sud (60°N-71°N) avec des valeurs comparables à celles mesurés dans les œufs de guillemots de latitudes similaires, confirmant également le possible rôle de la couverture de glace dans le contrôle de la photochimie aquatique du Hg.

Cette étude est actuellement en préparation pour publication.

Hg stable isotope variation of Alaskan marine mammal liver tissues

*Jérémy Masbou^{*1}, David Point¹, Jeroen E. Sonke¹, Paul R. Becker²*

¹Observatoire Midi-Pyrénées, Laboratoire Géosciences Environnement Toulouse, CNRS/IRD/Université Paul Sabatier Toulouse 3, 14 avenue Edouard Belin, 31400 Toulouse,

²National Institute of Standards and Technology, Analytical Chemistry Division, Hollings Marine Laboratory, 331 Fort Johnson Road, Charleston, South Carolina 29412 USA.

RECEIVED DATE

*Author for correspondence: jeremy.masbou@get.obs-mip.fr

Phone: +33 (0)5 61 33 26 07

Abstract

Recent work by our group on Hg stable isotopes in Alaskan seabird eggs (*Uria lomvia* and *Uria aalge*) and ringed seal (*Pusa hispida*) illustrated the control of sea ice cover on marine Hg photochemistry. Here, complementary mammal tissues from the NIST National Biomonitoring Specimen Bank have been analyzed to document the geographical variations in Hg stable isotope signatures of Arctic marine foodwebs. Hg stable isotope signatures were determined in liver samples of 55 beluga whales (*Delphinapterus leucas*) and 15 polar bears (*Ursus maritimus*) collected from 1989 to 2002. Large variations in $\delta^{202}\text{Hg}$ ($\approx 2.1\text{‰}$) and $\Delta^{199}\text{Hg}$ ($\approx 1.7\text{‰}$) are observed between species and within species stocks. Confronting polar bear data with those obtained previously in their primary prey item, ringed seal, shows the absence of mass independent fractionation (MIF) between prey and predator. Polar bear liver $\delta^{202}\text{Hg}$ is enriched in the heavy isotopes by $0.33 \pm 0.11\text{‰}$ (SE) compared to ringed seal $\delta^{202}\text{Hg}$.

Combining liver Hg isotope observations with ecological ($\delta^{15}\text{N}$ or $\delta^{13}\text{C}$) or metabolic (liver Hg speciation) parameters, we are able to explain how mammal habitat use and associated diet affect mercury isotopes signatures. Belugas are very sensitive to these parameters and individuals from each stock show significantly unique MDF/MIF combined signatures. As for seabird eggs, consistent north to south (60°N - 71°N) MIF gradients appear in mammal tissues, confirming the role of sea ice cover in modulating Hg photochemistry.

Introduction

Mercury in the Arctic has become a serious concern since the discovery of elevated mercury concentration in biota (Smith and Armstrong, 1975), contradicting with its considered status as a pristine ecosystem. In particular, the neurotoxic monomethylmercury (MMHg) form of Hg is known to biomagnify and bioaccumulate in marine food webs. Located at the top of the food chain, Arctic marine mammal exhibits some of the highest tissue Hg concentrations determined on earth (Lockhart et al., 2005). These high concentrations are supposed to be the cause of the adverse health effects observed for the native northern communities that consume their tissues as traditional food habits (Mckeown-Eyssen et al., 1983). The simultaneous occurrence of unique atmospheric Hg depositional conditions and springtime primary production has been long thought to be responsible for the enhanced production of bio-available MMHg in the Arctic marine ecosystem (Larose et al., 2011; Schroeder and Munthe, 1998). Yet the dominant site(s) of MMHg production, e.g. coastal sediments, cryosphere, marine water column, in the Arctic marine ecosystem are not well known (Hammerschmidt and Fitzgerald, 2006; Hammerschmidt et al., 2004; Heimbürger et al., 2010; Mason et al., 2012; Sunderland et al., 2009). However, the various geographical and temporal trends of Hg observed in biota suggest a much more complex picture of the Arctic bio-geochemical Hg cycle (AMAP, 2011). A climate influence in the *in-situ* production/degradation of MMHg prior to its incorporation into food webs has been hypothesized (Lockhart et al., 2005; Stern et al., 2012). In particular, the extensive loss of sea ice which has occurred over recent decades in the Arctic region is, undoubtedly, one of the most dramatic physical change (Maslanik et al., 2007). Ringed seals, beluga whales and polar bears habitat is deeply linked to sea ice, likely suggesting that the investigation of these species might help understanding better the effect of climate change on MMHg exposure (Gaden et al., 2009; Gaden and Stern, 2010).

Hg stable isotopic compositions in biota tissues are supposed to reflect a combination of both ambient Hg for which its signature may be altered by internal metabolic processes exposure (Blum et al., 2013; Point et al., 2011). Mass dependent Hg isotope fractionation (MDF, $\delta^{202}\text{Hg}$) is observed during both abiotic and biotic reactions (Kritee et al., 2013; Yin et al., 2010). Large mass independent Hg isotope fractionation (MIF, $\Delta^{199}\text{Hg}$) occurs predominantly during photo-induced reactions such as Hg^{2+} photo-reduction or MMHg photo-demethylation in water (Bergquist and Blum, 2007; Zheng and Hintelmann, 2010). With the absence of MIF during biotic processes, the photochemical MMHg $\Delta^{199}\text{Hg}$ signature is likely conserved up in the food chain and kept un-altered in marine mammal tissues (Masbou J. et al., Subm). The investigation of $\Delta^{199}\text{Hg}$ magnitude in mammal tissues can thus be then used to quantify Hg photoreduction conditions in aquatic ecosystem. Since sea-ice cover act as a physical barrier between ocean and atmosphere, two studies by our group have suggested its direct

implication to explain both geographical (Point et al., 2011) and temporal (Masbou J. et al., Subm) Hg MIF variation observed across different marine mammal species.

In this study, we complemented our previous dataset with measurements of Hg isotopic compositions in n=55 beluga whale and n=15 polar bear liver sample tissues collected at different Alaskan locations over the same period of time. Additional parameters such as Hg speciation and $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ were also determined to account for the influence of internal metabolic effects and habitat use.

Materials and methods

Sampling

Beluga whale and polar bear liver samples were collected as part of the Alaska Marine Mammal Tissue Archival Project (AMMTAP). The tissues were collected by Alaskan native subsistence hunters and were homogenized and archived under cryogenic conditions by the National Bio-monitoring Specimen Bank (NBSB) located the National Institute of Standard and Technology (NIST, Charleston, SC). Standard preparation protocols are described by (Becker et al., 1991). Samples were shipped under liquid nitrogen and were stored at -80°C at the Geosciences Environnement Toulouse Laboratory until analysis.

In this study, liver samples of 55 beluga whales (BW, *Delphinapterus Leuca*), 15 polar bears (PB, *Ursus Maritimus*) were analyzed, complementary to the 53 ringed seals (RS, *Pusa Hispida*) analyzed in Masbou et al.. All samples cover a period of time between 1988 and 2002. Sampling locations are indicated in figure 1. Beluga whale samples were collected at 5 different locations every year. In Barrow (n=4), Point Lay (n=25), Point Hope (n=4), Norton Sound (n=4) and Cook Inlet (n=17) respectively. Most Polar bear samples were collected in Barrow (n=10), with additional samples originating from Gambell (n=1), Little Diomedede (n=1), Point Lay (n=1), Prudhoe Bay (n=1) and Savoonga (n=1). For clarity these locations have not been included in the Figure 1, but they are presented in Figure S1. Specimen specifications such as sex, length and weight have been determined on-site. As detailed in Masbou et al. (Subm), ringed seal samples originates from two different locations; Barrow (n=39) and Nome (n=14). Age determination has been subsequently made on 24 BW, 9 PB and 48 RS by counting visible teeth or by the claw growth layer rings method.

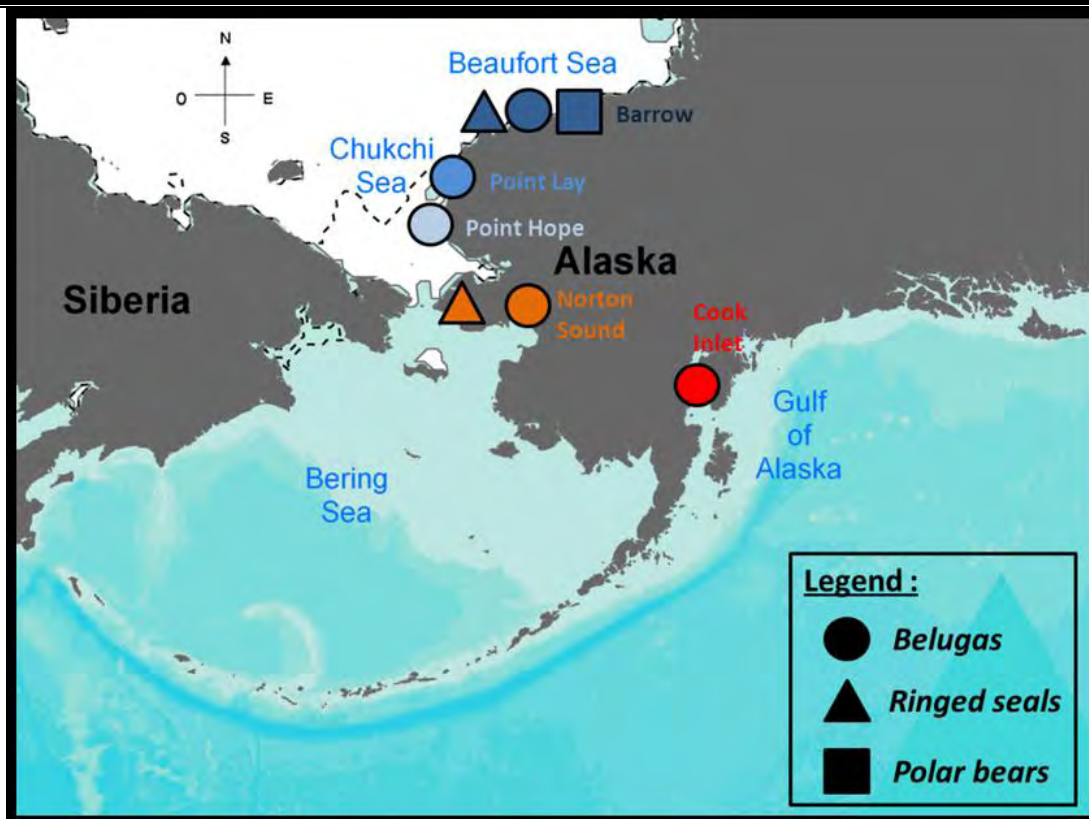


Figure 1: Sampling locations of the 55 beluga whales, the 53 ringed seals and the 15 polar bears

Analysis

All preparation and analysis protocols have been detailed in a previous paper (Masbou J. et al., Subm, Chapter 4). Briefly, carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) isotope ratios were measured on defatted sample fractions (Bligh and Dyer, 1959) by Elemental Analysis - Isotope Ratio Mass Spectrometry (EA-IRMS) at the Stable Isotope Facility of LIENSs laboratory (La Rochelle, France). External instrument reproducibility for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ is typically $\pm 0.1\%$. Total mercury concentration (expressed on a wet weight basis) of fresh frozen samples were determined in triplicate by atomic absorption after combustion and gold trapping using a DMA-80 analyzer (Milestone, USA) at the GET laboratory. Measurements accuracy was checked against reference material: NRCC-DORM-2 (dry dogfish muscle), NIST-SRM 1947 (fresh-frozen truit tissue) and a similar in house matrix reference material: NIST QC03LH03 (whale liver control material). Mercury concentrations of reference materials were not statistically different from the certified values (Table S1). Methylmercury concentration measurements were performed on selected samples at the LCABIE laboratory (Pau, France), by isotope dilution gas chromatography inductively coupled plasma and mass spectrometry (ID-GC-ICPMS) (Point et al., 2008; Point et al., 2007).

Mercury isotopic compositions were measured at the Observatoire Midi-Pyrenees using multi-collector inductively coupled plasma mass spectrometry (MC-ICP-MS; Thermo Finnigan Neptune) with continuous flow cold vapor (CV) generation using Sn(II) reduction (CETAC HGX-200). Mercury isotopic composition is expressed in δ notation and reported in parts per thousand (‰) deviations from the NIST SRM 3133 standard, which was determined by sample-standard bracketing according to the following equation:

$$\delta^{xxx}\text{Hg} = \left[\left(\frac{\left(\frac{^{xxx}\text{Hg}}{^{198}\text{Hg}} \right)_{\text{sample}}}{\left(\frac{^{xxx}\text{Hg}}{^{198}\text{Hg}} \right)_{\text{NIST 3133}}} \right) - 1 \right] \times 1000 \quad (\text{‰})$$

where xxx represents the mass of each mercury isotope

$\delta^{202}\text{Hg}$ characterizes the mass dependent isotope fractionation (MDF) while mass independent isotope fractionation (MIF) is expressed by the Δ notation:

$$\Delta^{199}\text{Hg}(\text{‰}) = \delta^{199}\text{Hg} - (\delta^{202}\text{Hg} \times 0.252)$$

$$\Delta^{200}\text{Hg}(\text{‰}) = \delta^{200}\text{Hg} - (\delta^{202}\text{Hg} \times 0.502)$$

$$\Delta^{201}\text{Hg}(\text{‰}) = \delta^{201}\text{Hg} - (\delta^{202}\text{Hg} \times 0.752)$$

Sample preparation is detailed in the ESI of Chapter 4. Briefly, final analyzed solutions containing between 1 to 5 ng Hg.g⁻¹ and matching NIST 3133 concentrations within 15% were analyzed by CV-MC-ICP-MS. Depending on the sample mass available for analysis, sample measurements were replicated between 1 to 4 times.

Long term reproducibility between the different series of experiments, was evaluated with the matrix matched whale liver NIST QC03LH03 in-house control material. Measurements performed at different concentration levels were highly consistent in terms of precision and accuracy (ESI, Chapter 4). Within all, a long-term reproducibility of 0.14‰ and 0.11‰ (2SD, n=31) was observed for $\delta^{202}\text{Hg}$ and $\Delta^{199}\text{Hg}$ respectively. Secondary reference material UM-Almaden was also analyzed, with $\delta^{202}\text{Hg}$ values of $-0.53 \pm 0.10\text{‰}$ (2SD, n=46) consistent other published values (ESI, Chapter 4) (Bergquist and Blum, 2007). Uncertainties applied to samples were the larger of either the 2SD on the QC03LH03 control material or the 2SE on sample replicates.

Statistics

Statistical analyses were performed using JMP® software (SAS Institute, USA). One-way ANOVA tests were performed when comparing two datasets. Homogeneity of variances was tested using the Brown-Forsythe test. In the case of unequal variances, a Welch ANOVA test was used.

Marine mammal foraging ecology

Beluga foraging ecology and migration routes

Beluga whales forage on a mix of fish (polar cod, pacific sand lance) and crustaceans (euphausiacea, mysidacea, zooplankton, amphipoda, northern shrimp) (Dehn et al., 2007; Pauly et al., 1998). Alaskan BW are distributed among five stocks showing different genetic material and seasonal migration routes (Angliss et al., 2001; Frost and Lowry, 1990; O'Corry-Crowe et al., 1997). The Cook Inlet Stock (CI) is well defined since most of the BW from this stock show no annual migrations and stay in the Cook Inlet bay area (Hobbs et al., 2005). This is the most genetically distinct group and potential exchange with other stocks is unlikely (O'Corry-Crowe et al., 1997). The East Bering Sea Stock (EBS) considers BW foraging in the Norton Sound summer aggregation area (64°N). Despite the lack of ecological studies for this stock, their overwintering ground investigated using satellite telemetry appears to cover the mid/south Bering Sea over the shelf area between 58-60°N. The East Chukchi Sea stock (ECS) is well documented and consider BW samples obtained at Point Lay and Barrow. Beluga whales from this stock are known to overwinter in the northern Bering Sea and follow the coast up north in spring until Barrow and Point Lay where they have been observed raising their calves and molting in the coastal zone. Stomach content studies revealed empty stomachs contents during the late winter/early spring period, possibly suggesting that most of the foraging and by extent MMHg exposure is related to the summer grounds (Suydam et al., 2005). During late spring and summer, satellite telemetry studies indicate that BW from this stock migrate north of Barrow, foraging intensively on the shelf break and in Barrow's canyon (juveniles and adults). However, experienced males and females were observed to feed much more offshore and deeply (200-1000m) in the open Chukchi sea and Beaufort sea, up to the central Arctic basin under heavy sea ice conditions (>90%) (Citta et al., 2013). Finally, BW from the East Beaufort Sea stock (EBS) overwinter in the northern Bering Sea and pass Point Hope in early spring to reach their Beaufort Sea summer ground (Mackenzie River delta and Amundsen Gulf) (Loseto et al., 2006; O'Corry-Crowe et al., 2002). The BW stock differences, and by extent the different geographical habitat for each of these groups is well evidenced with unique $\delta^{13}\text{C}$ vs $\delta^{15}\text{N}$ signatures combinations (Figure 2).

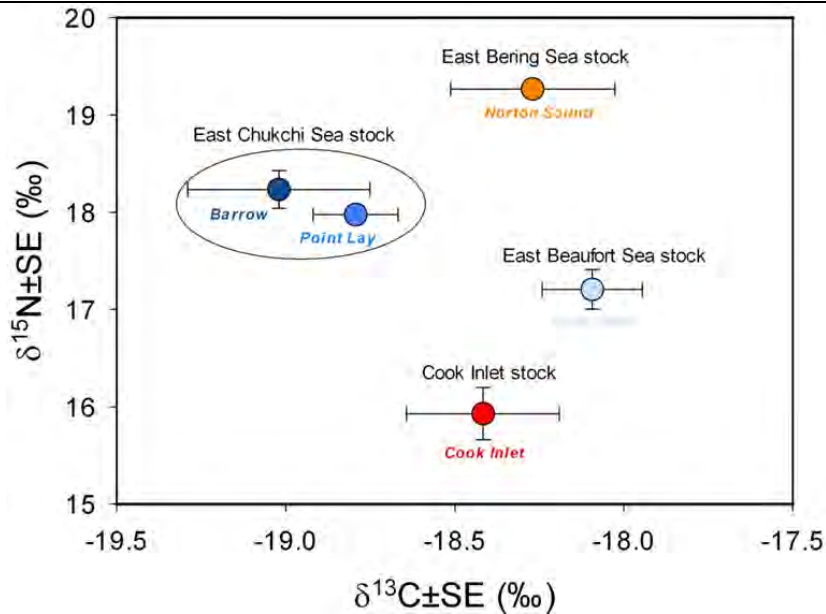


Figure 2: Beluga whale stock segregation based on $\delta^{13}\text{C}$ vs $\delta^{15}\text{N}$ variation.

Ringed Seals foraging ecology and migration routes

Ringed seals foraging ecology and migration routes have already been described in our previous publication (Chapter 4, (Masbou J. et al., Subm)). In brief, such as BW, RS is an opportunistic and euryphagous species, feeding heavily on fish (arctic/polar cod, Pacific sand lance) and crustaceans (Euphausiacea, Mysidacea, Zooplankton, Amphipoda, Northern Shrimp) (Dehn et al., 2007). Following the seasonal movement of shore fast and pack ice, ringed seals from Nome migrate from the Bering Sea in winter to the Chukchi Sea in spring/summer foraging over the continental shelf (Crawford et al., 2012). Individuals from Barrow occupy a slightly northern habitat, wintering in the western Chukchi Sea and northern Bering Sea, and migrating during spring and summer eastward, parallel to the continental shelf break towards the eastern Beaufort Sea. Besides showing strong breeding site fidelity, field observations and satellite telemetry studies also show similar inter-annual foraging range at the population level (Harwood et al., 2012a; Kelly et al., 2010a; Kelly et al., 2010b). Ringed seals differ from BW because of their individual behavior and their restrained habitat in the shore zone (<100 km) and in low depth waters (<100m) (Crawford et al., 2012; Harwood et al., 2012).

Polar Bear foraging ecology (and movements)

Polar bears main prey items are RS (Derocher et al., 2002; Smith, 1980). As the PB primary prey (Derocher et al., 2002), RS provide them the largest caloric intakes especially during breeding and molting periods (Lønø and Polarinstittut, 1970; Stirling and Archibald, 1977). Polar bears movement follows exactly those of RS previously detailed (Garner et al., 1990).

Results and discussion

HgT concentrations and isotopic compositions are presented in Table S1 for BW and PB and in our previous publication for RS (Masbou J. et al., Subm, Chapter 4). HgT concentration levels were $2.7 \pm 3.4 \mu\text{g.g}^{-1}$ ($\pm\text{SD}$, range: 0.09-13.9 $\mu\text{g.g}^{-1}$, n= 53), $13 \pm 13 \mu\text{g.g}^{-1}$ ($\pm\text{SD}$, range: 3.5-54 $\mu\text{g.g}^{-1}$, n= 15) and $23 \pm 32 \mu\text{g.g}^{-1}$ ($\pm\text{SD}$, range: 0.44-119 $\mu\text{g.g}^{-1}$, n= 55) for RS, PB and BW respectively. These values (magnitudes and ranges) are consistent with previous measurements on mammal livers from the same region (Table S2). Regarding BW from Point Lay, bio-accumulation over time appears to be the main factor driving HgT concentrations in liver (age vs HgT, $r^2=0.89$, $p^*<0.001$, n=16, Figure S3). This process appears of lower magnitude in RS for which bio-accumulation explains only 22% of the HgT variability (age vs HgT, $r^2=0.22$, $p^*<0.01$, n=38, (Masbou J. et al., Subm)). With four individual of known age, polar bear dataset is not sufficient for accurate age vs HgT regression determinations.

Mercury stable isotopic compositions have been determined on the total Hg fraction and are displayed in Figure 2. Hg MDF ($\delta^{202}\text{Hg}$) values ranged from $-1.46 \pm 0.14\text{‰}$ to $0.56 \pm 0.14\text{‰}$, with a mean value of $-0.33 \pm 0.56\text{‰}$ (SD, n=122). At the Alaskan region level, inter-species significant differences could be observed with a mean $\delta^{202}\text{Hg}$ of $-0.63 \pm 0.63\text{‰}$ (SD, n=54) for belugas, $-0.17 \pm 0.33\text{‰}$ (SD, n=53) for ringed seals and $0.17 \pm 0.33\text{‰}$ (SD, n=15) for polar bears. Figure 2 show a mainly positive $\delta^{199}\text{Hg}$ shift from the theoretical MDF line, exhibiting positive $\Delta^{199}\text{Hg}$ isotopic anomalies. This is particularly true for ringed seal and polar bears that show identical Hg MIF values $\Delta^{199}\text{Hg}$ of $0.51 \pm 0.17\text{‰}$ (SD, n=54) and $0.55 \pm 0.23\text{‰}$ (SD, n=15) respectively. For BW, positive $\Delta^{199}\text{Hg}$ values were determined for all groups ($0.50 \pm 0.65\text{‰}$, SD, n=54) except for the ECS for which zero to negatives Hg MIF values were observed ($-0.03 \pm 0.12\text{‰}$ SD, n=29).

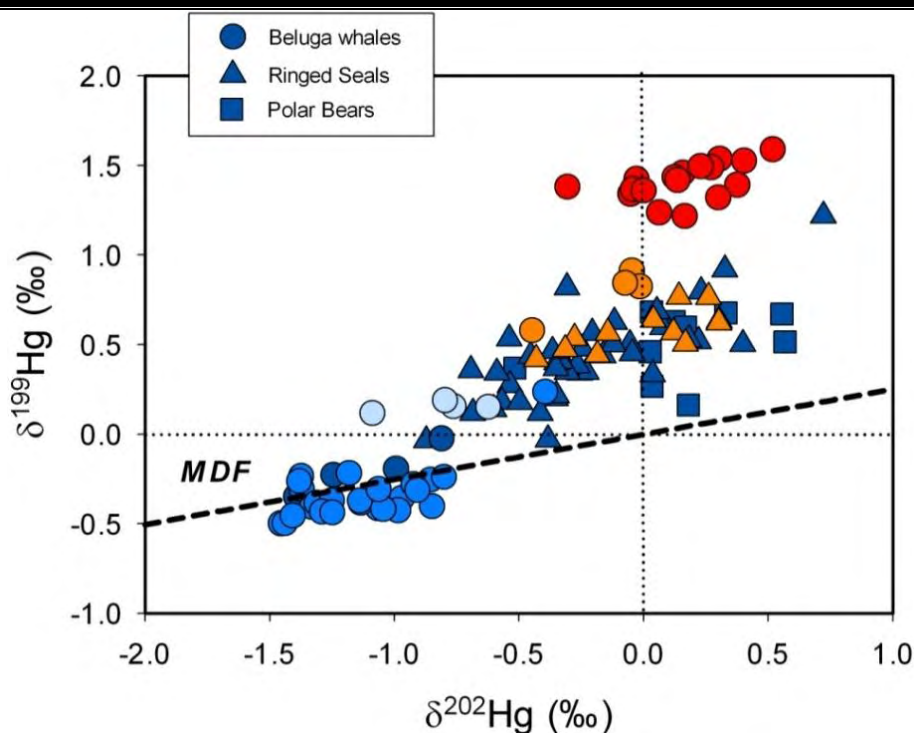


Figure 2: $\delta^{199}\text{Hg}$ vs $\delta^{202}\text{Hg}$ tri-isotopic plot for beluga whales (circles, $n=55$), ringed seals (triangles, $n=53$) and polar bear (squares, $n=15$) from the different sampling locations detailed in Figure 1.

Contribution of Hg isotopes for detecting bio-accumulation pattern differences among species

The overall eight fold higher HgT concentrations observed in BW compared to RS (Welch t-test, $p^* < 0.001$, $n=107$) raises the question of Hg bio-accumulation patterns between the two species. Typical age vs HgT relationship confirms that the large mean age difference between BW (24 ± 14 years old, SD, $n=23$) and RS individuals (4 ± 4 years old, SD, $n=49$) is likely at the basis of the observed HgT level differences. Although there are two outlier values at extreme ages (5 and 55 years old), BW display a strong age vs HgT trend (Figure 3 and S3, quadratic regression, $r^2=0.89$, $p^* < 0.001$, $n=16$) indicative of strong Hg bioaccumulation in the liver. With overall younger individuals, RS exhibit less pronounced bioaccumulation (linear regression, $r^2=0.22$, $p^* < 0.01$, $n=38$, (Masbou J. et al., Subm)). In addition, RS Hg excretion by hair loss has been suggested as an important pathway to eliminate Hg (Brookens et al., 2007; Brookens et al., 2008), and adds a supplementary and significant excretion route to feces and urine. A possible consequence would be a higher Hg elimination rate in RS limiting the bioaccumulation rate compared to BW.

These differences in HgT accumulation levels between RS and BW species are accompanied by specific Hg MDF patterns. BW $\delta^{202}\text{Hg}$ clearly increases with age ($r^2=0.67$, $p^* < 0.001$, $n=18$, Figure 3). In contrast, an inverse relationship is observed for RS $\delta^{202}\text{Hg}$, with however lower statistical

significance ($r^2=0.18$, $p^*<0.01$, $n=38$, (Masbou J. et al., Subm), Chapter 4). The RS age vs. $\delta^{202}\text{Hg}$ trend was interpreted as the result of metabolic enrichment of the liver in the lighter Hg isotopes during hepatic MMHg demethylation. BW $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ do not correlate with the age related increase in $\delta^{202}\text{Hg}$ ($r^2=0.03$, $p=0.52$, $n=18$ and $r^2=0.04$, $p=0.40$, $n=18$ respectively). Therefore, differences of foraging behavior with age can likely be excluded as an explanation for the progressive enrichment of liver tissue in the Hg heavy isotopes. BW liver $\Delta^{199}\text{Hg}$ (from Point Lay) does not correlate with age ($r^2=0.21$, $p=0.06$, $n=18$). Such as for RS and seabird bioindicator tissues, $\Delta^{199}\text{Hg}$ also does not correlate with $\delta^{15}\text{N}$ ($r^2=0.11$, $p=0.11$, $n=25$) or $\delta^{13}\text{C}$ ($r^2=0.1$, $p=0.91$, $n=25$) (Masbou J. et al., Subm; Point et al., 2011).

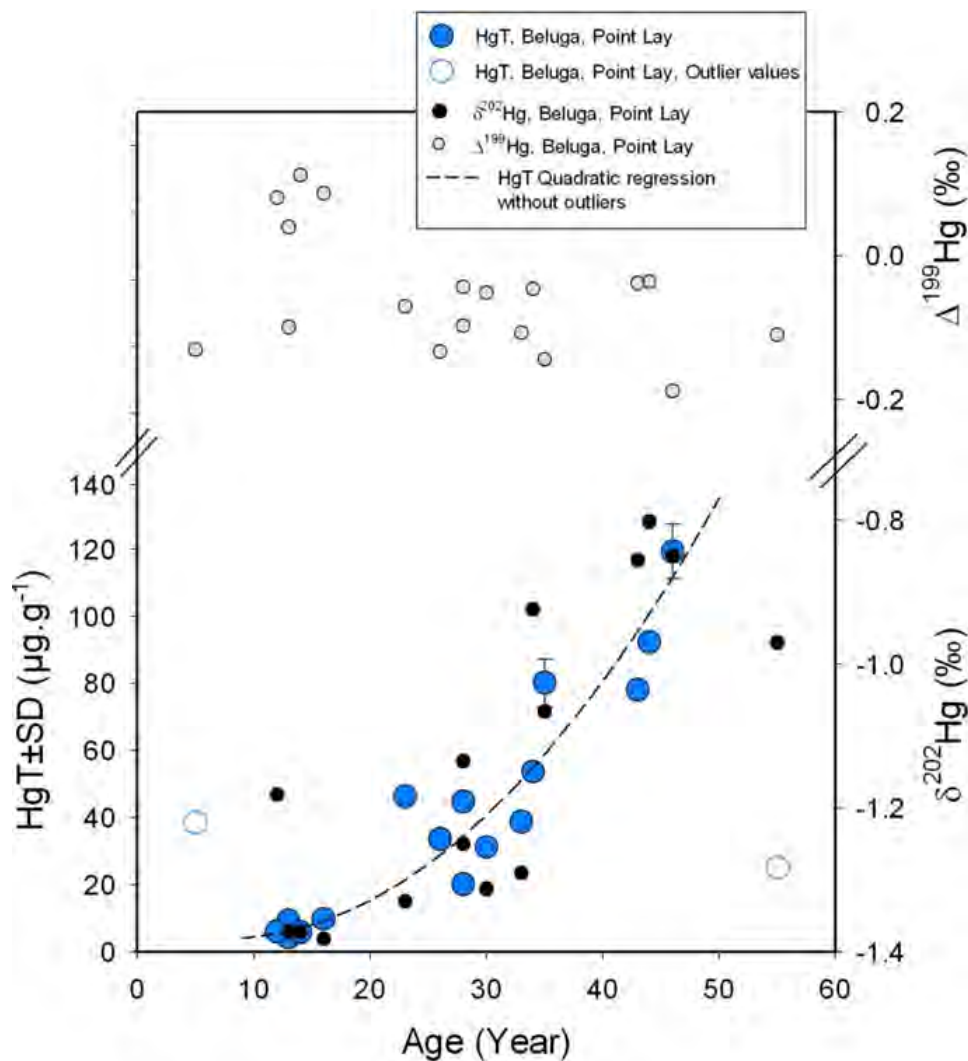


Figure 3: HgT (blue or white circles, left axis), $\delta^{202}\text{Hg}$ (black dots, right bottom axis) and $\Delta^{199}\text{Hg}$ (grey dots, right top axis) vs age for beluga whales from Point Lay sampling locations ($n=18$).

Hg speciation analysis on selected ringed seal and beluga liver samples showed a typical decrease in the MMHg fraction with the increasing HgT concentrations (power law fit, Figure 4 and Figure S4) (Becker et al., 2000; Caurant et al., 1996). While MMHg accounts for 1% to 39% in both

RS and BW species, the regression curve equations differ from $0.1084x-0.69$ ($r^2=0.92$, $p^*<0.001$, $n=18$) to $0.5857x-0.74$ ($r^2=0.85$, $p^*<0.001$, $n=18$) for RS and BW respectively (Figure S4). As suggested in previous studies, the low liver MMHg fractions compared to those observed in prey and their correlation with HgT concentrations are indicative of in-vivo hepatic MMHg demethylation (Eagles-Smith et al., 2009; Wagemann et al., 2000). The more abrupt decrease in the liver MMHg fraction observed in RS liver suggests that at a given HgT concentration, the fraction of MMHg is lower than that in BW. This is consistent with the idea that RS excrete significant amounts of MMHg by hair shedding, which limit thus MMHg inputs into liver. The low HgT bio-accumulation patterns and the limited MMHg fraction range vs $\delta^{202}\text{Hg}$ relationship observed in RS (Masbou J. et al., Subm) raise the idea of high excretion fluxes making the RS body an open system where Hg fractionation is emphasized. As previously done (Masbou J. et al., Subm), modeled complementary MMHg/HgT fractions from non-analyzed samples were calculated from experimental HgT vs MMHg fraction relationships. Modeled and experimental data were thus confronted to Hg isotopic parameters (Figure S5 and (Masbou J. et al., Subm)). $\delta^{202}\text{Hg}$ values reveal low sensitivity to MMHg fraction in BW livers ($r^2=0.05$, $p=0.32$, $n=25$, Figure S5), except removing MM15L058C individual ($r^2=0.23$, $p^*<0.05$, $n=24$). Again, the strong bio-accumulation patterns and low $\delta^{202}\text{Hg}$ vs MMHg/HgT relationship observed in BW are consistent with a close system with low excretion fluxes.

In term of MIF, $\Delta^{199}\text{Hg}$ in BW livers revealed significant relationship with MMHg fraction ($r^2=0.81$, $p^*<0.001$, $n=24$, Figure S5) which contrast apparently with the RS data (Masbou J. et al., Subm). While significant in-vivo MIF may be considered, no differences between MMHg and iHg MIF signatures were determined by the compound specific analysis because of the large uncertainties of the method, within the uncertainties of the GC-MC-ICP-MS used (Chapter 6, (Perrot et al., In Prep)). This suggests that in vivo Hg MIF is unlikely as observed in other studies (Kwon et al., 2012; Laffont et al., 2009) and ringed seals (Masbou et al., Subm). A closer inspection of the trend reveals different pools of points that may reflect the confounding effect of differences in Hg exposure between juveniles from the ECS (MMHg/HgT>10%) that forage on the shelf, whereas adults ((MMHg/HgT<10%) forage relatively more up north in a more pelagic ecosystem. Latitudinal Hg MIF trends were previously observed on Guillemot eggs from the same region (Point et al. 2011).

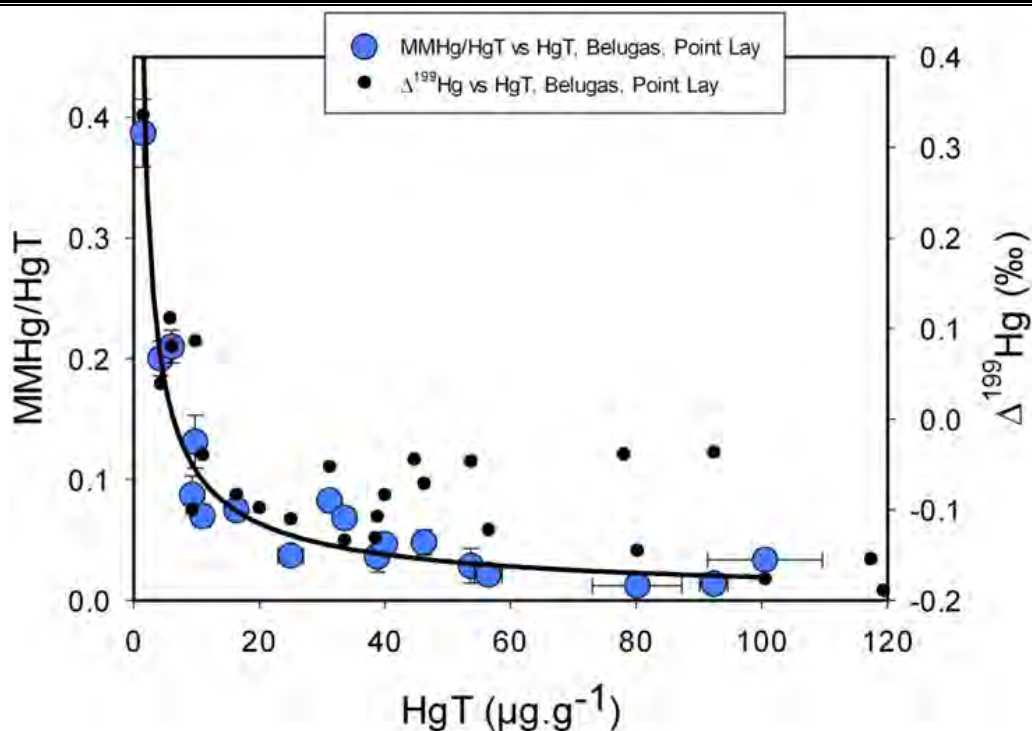


Figure 4: MMHg/HgT (blue circles, left axis, $n=18$) and $\Delta^{199}\text{Hg}$ (black dots, right axis, $n=24$) vs HgT for beluga whales from the Point Lay sampling location.

The prey/predator relationship between RS and PB is confirmed by the $4.3 \pm 0.3\text{‰}$ ($\pm\text{SE}$) increase observed in $\delta^{15}\text{N}$ values, consistent with the $3.4 \pm 1\text{‰}$ shift usually used in the Arctic ecosystem to consider the difference between two trophic levels (Post, 2002). Polar bears exhibit five times higher (one-way ANOVA, $p^* < 0.001$) HgT concentrations ($15.3 \pm 13.6 \mu\text{g.g}^{-1}$, SD, $n=12$) compared to RS ($3.2 \pm 3.8 \mu\text{g.g}^{-1}$, SD, $n=39$), in agreement bio-amplification patterns (Dehn et al., 2006). Comparison of Hg isotope signatures between RS and PB (Figure 2) clearly show that the Hg isotope signature of PB is inherited from the RS Hg isotope signature, with nearly identical Hg MIF values, but with a slight Hg MDF shift. Mean PB $\delta^{202}\text{Hg}$ of $0.09 \pm 0.31 \text{‰}$ ($\pm\text{SD}$, $n=12$) is significantly higher than RS $\delta^{202}\text{Hg}$ of $-0.24 \pm 0.33 \text{‰}$ ($\pm\text{SD}$, $n=39$) resulting in a slight increase of $0.33 \pm 0.11\text{‰}$ ($\pm\text{SE}$) from prey to predator during trophic transfer. This result contrasts with the $2.0 \pm 0.2\text{‰}$ observed by Laffont et al. (2009) between fish muscle and human hair (Laffont et al., 2009). The difference in the trophic $\delta^{202}\text{Hg}$ increase may be related to the different tissues examined in this study compared to Laffont et al. (2009). However, the 0.3‰ enrichment in PB may also be the result of the $\delta^{202}\text{Hg}$ sensitivity to Hg speciation (Masbou J. et al., Subm). Complementary Hg speciation analysis of PB liver samples would be required to confirm this hypothesis. While MDF signatures between PB and RS differ slightly, no statistical Hg MIF signatures ($\Delta^{199}\text{Hg}$) differences could be detected (RS ($0.48 \pm 0.19\text{‰}$, SD, $n=39$) to PB ($0.47 \pm 0.16\text{‰}$, SD, $n=12$)). This confirms the absence of Hg MIF during trophic transfer and internal metabolic processes (Kwon et al., 2012; Laffont et al., 2009, Masbou et al. Subm).

Hg MIF geographical patterns interpretation

The five different sampling locations for BW, RS, PB and seabirds cover latitudes from 60°N to 71°N and allow a geographical Hg isotope analysis (Figure 1). Figure 5 shows steady Hg MIF signatures between 50-60°N and a significant and continuous decreasing trend between 60-75°N while increasing latitude.

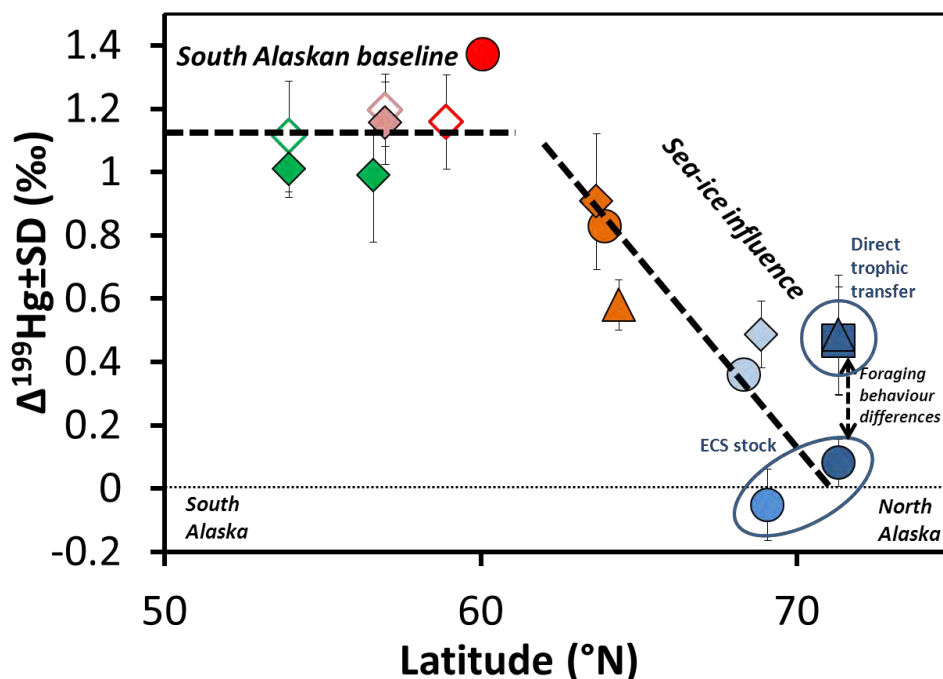


Figure 5: Influence of latitude of sampling on $\Delta^{199}\text{Hg}$ values for mammals and seabirds samples.

In addition to fit on the same $\Delta^{199}\text{Hg}$ decreasing trend, BW, RS and murre egg $\Delta^{199}\text{Hg}$ values are similar when their respective sampling locations are close confirming the effect of latitude on the registered MIF signatures for the different species considered. The consistency of the Hg MIF latitudinal trend across these three different species that occupy different habitat and foraging behavior may suggest that it ecosystem wide and with a geochemical forcing origin. Interestingly, BW exhibit small MIF variations at the stock level compared to RS or seabird eggs, which may be related to the fact that BW are known to forage in groups of several individual, likely reflecting similar Hg exposure and foraging habitat. The south Alaskan/North Pacific MIF baseline observed at low latitudes (<60°N) in murre eggs ($\Delta^{199}\text{Hg}=1.13\pm 0.15\text{‰}$, SD, n=36), is reached and slightly exceeded (Student t-test, $p^* < 0.001$) by Cook Inlet BW samples ($\Delta^{199}\text{Hg}=1.37\pm 0.09\text{‰}$, SD, n=17). Significantly higher $\delta^{13}\text{C}$ (one-way ANOVA, $p^* < 0.0001$, n=22) and $\delta^{15}\text{N}$ (Welch ANOVA, $p^* < 0.0001$, n=22) are observed between Cook Inlet BW (n=17, 60°N) and East Amatuli Island murre eggs (n=5, 59°N), and likely reflect a gradual change in habitat from riverine/estuarine to offshore (Day et al., 2012). On the

contrary, $\Delta^{199}\text{Hg}$ magnitudes are similar for BW and murre eggs collected at other common sampling latitudes. $\Delta^{199}\text{Hg}$ in BW from Norton Sound (n=5, 64°N) and Point Hope (n=4, 68°N) are non-significantly different (one-way ANOVA, p=0.60 and p=0.051) from seabird eggs from St Lawrence Island (n=2, 64°N) and Cape Lisburne (n=5, 69°N) respectively. The overall similar $\Delta^{199}\text{Hg}$ magnitudes among these two species and tissues confirm their relevance for geographical MMHg exposure tracing. Murre eggs are known to integrate Hg exposure from a recent period and a geographically restrain area. In contrast, BW liver tissue likely integrates MMHg exposure over longer periods, and BW migrate over larger distances (except Cook Inlet). Consequently similar $\Delta^{199}\text{Hg}$ for murre and BW suggests that the BW summer diet likely dominates MMHg exposure detected in BW liver. This is consistent with BW stomach contents analysis showing empty stomachs in late winter/early spring (Citta et al., 2013).

As expected, Point Lay and Barrow BW sampling locations show low $\Delta^{199}\text{Hg}=-0.05\pm 0.11\text{‰}$ (SD, n=25) and $\Delta^{199}\text{Hg}=0.08\pm 0.07\text{‰}$ (SD, n=4) values respectively. Despite the slight difference observed (Student t-test, $p^* < 0.05$, n=29), these close values are consistent with the fact that they belong to the same stock. Regarding the foraging behavior of the individuals from the ECS stock, experienced male and females are known to forage in heavy sea-ice conditions (>90%), and at higher latitudes, up to 81°N for some adult males, (Citta et al., 2013)). Zero Hg MIF anomalies observed for BW of the ECS is thus consistent with the foraging in ice covered waters showing extremely limited Hg photochemistry conditions.

Hg MIF as a abiotic marker of foraging habitat

Barrow (71°N) exhibits an interesting study case with data for the possible comparison with three mammal species. While PB and RS show identical $\Delta^{199}\text{Hg}$ values of $0.48\pm 0.18\text{‰}$ (SD, n=51), BW collected in Barrow differ significantly, showing a lower $\Delta^{199}\text{Hg}$ mean value of $0.08\pm 0.07\text{‰}$ (SD, n=4). Since the MIF signatures in fish from the North Pacific Subtropical Gyre have been inversely related to foraging depth (Blum et al., 2013), we interpret these depleted $\Delta^{199}\text{Hg}$ as a consequence of the foraging and diving behavior of the ECS BW. With frequent dives under sea ice in the north Beaufort Sea deep waters detected by telemetric studies (dives until 1000m, (Citta et al., 2013)), BW integrate MMHg from a habitat where Hg photochemistry is limited by the available light (depth and sea ice cover). RS and PB are much more restrained to shallow waters of the Chukchi Sea and southern Beaufort Sea (<100m) where photochemistry is seasonally present due to sea ice dynamics (Fetterer et al., 2002).

The above discussed foraging behavior differences are not confirmed by $\delta^{13}\text{C}$ ecological tracer which suggest similar carbon sources (one-way ANOVA, p=0.59) between ECS BW ($-18.7\pm 0.6\text{‰}$, SD n=33) and RS ($-18.6\pm 0.8\text{‰}$, SD n=39). Only $\delta^{15}\text{N}$ displays a small but significant (one-way

ANOVA, $p^* < 0.001$) difference from 17.9 ± 0.5 ‰ (SD, $n=33$) to 16.9 ± 0.9 ‰ (SD, $n=39$) for ECS BW and Barrow RS respectively. This slight difference suggests that belugas feed on slightly higher trophic level organisms or in a higher $\delta^{15}\text{N}$ baseline zone (Schell et al., 1998). Interestingly, closer inspection of the ECS BW has revealed a sex related difference in $\delta^{15}\text{N}$. With a magnitude of 18.1 ± 0.4 ‰ (SD, $n_{\text{Male}}=23$) against 17.5 ± 0.4 ‰ (SD, $n_{\text{Female}}=10$), males affect significantly (one-way ANOVA, $p^* < 0.001$) the overall $\delta^{15}\text{N}$ value. Samples have been taken during the breeding/lactating period and differences in feeding routes between the two sexes can be expected (Citta et al., 2013). On the contrary, none of the Hg parameters (HgT, $\delta^{202}\text{Hg}$ and $\Delta^{199}\text{Hg}$) show sex dependence. Supposed differences in turnovers between C/N (several days, (Ramos and González-Solís, 2012)) and Hg (several weeks to years, (Tillander et al., 1970)) are likely at the basis of the fact that inspection of ecological parameters does not allow to explain the MIF magnitude difference between the two species.

RS and PB Barrow $\Delta^{199}\text{Hg}$ magnitudes are non-significantly different (one-way ANOVA, $p=0.22$ and $p=0.21$ respectively) from the BW from Point Hope location. Unlike ECS stock, BW from EBfS stock have a more coastal migration route up to the Mackenzie or Amundsen rivers confirmed by their significantly lower $\delta^{13}\text{C}$ values (one-way ANOVA, $p^* < 0.05$, $n=34$, Figure 2) (O'Corry-Crowe et al., 2002). This migration route is consistent with the Barrow RS and PB home range, thus resulting in similar $\Delta^{199}\text{Hg}$. Through these results we show the relevant contribution of Hg MIF isotopes as a new relevant abiotic tracer of marine mammal and seabird foraging habitat.

MIF origin

The relationship between $\Delta^{199}\text{Hg}$ and $\Delta^{201}\text{Hg}$ signatures has been shown to be experimentally different for DOC mediated iHg photoreduction ($\Delta^{199}\text{Hg}:\Delta^{201}\text{Hg}$ regression slope of 1.0) and MMHg photodemethylation (slope of 1.3) in a simulated freshwater environment (Bergquist and Blum, 2007). The overall regression slope for the combined marine mammal dataset in this study is 1.07 ± 0.01 (SE). Individual slopes are 1.07 ± 0.01 , 1.06 ± 0.04 and 0.97 ± 0.03 for BW, PB and RS respectively (Figure 6). These slopes, which are closer to 1.0 than to 1.3 suggest that the variation in $\Delta^{199}\text{Hg}$ and $\Delta^{201}\text{Hg}$ signatures are possibly due to iHg photo-reduction in arctic marine waters before Hg bioaccumulation into top predator tissues (Bergquist and Blum, 2007; Zheng and Hintelmann, 2009). The marine mammal slope of 1.07 contrasts with the $\Delta^{199}\text{Hg}/\Delta^{201}\text{Hg}$ regression slope of 1.26 of our Alaskan Arctic sea bird study and with several studies on marine biota where $\Delta^{199}\text{Hg}/\Delta^{201}\text{Hg}$ slopes of 1.15 to 1.25 dominate (Bergquist and Blum, 2007; Blum et al., 2013; Gehrke et al., 2011; Senn et al., 2010).

Closer inspection of the single sea bird colony in the Chukchi Sea however reveals a much lower $\Delta^{199}\text{Hg}/\Delta^{201}\text{Hg}$ slope of 1.1 ± 0.3 not significantly different from the 1.09 ± 0.04 slope obtained on murre eggs by (Day et al., 2012) in the same region and from the marine mammal slope of

1.07±0.01 observed in this study. In other regions, closer inspection of the (Blum et al., 2013) study reveals slopes for individual fish species from 1.04±0.04 (SE, n=10) to 1.20±0.01 (SE, n=28). These observed variations in MIF slopes may indicate that the bioindicators register a mixture of iHg and MMHg photoreduction/demethylation processes. iHg is the precursor to MMHg, and it is therefore likely that the two photochemical reactions occur before MMHg integrates the food web. It should be noted however that the supposed endmember slopes were studied on experimental freshwater solutions and not on seawater. Also, a second experimental study on iHg photoreduction in natural lake waters has shown slopes ranging from 1.2 to 1.3 (Zheng and Hintelmann, 2009). Similar studies on the variability of MMHg demethylation slopes have not yet been undertaken. Previous studies on Hg MIF have not examined the intercept of the $\Delta^{199}\text{Hg}/\Delta^{201}\text{Hg}$ regression lines. Here we observe significantly positive intercepts observed for BW (intercept: 0.09±0.02, SE, n=54), RS (0.10±0.03, SE, n=53), PB (0.10±0.09, SE, n=15).

This observation is not unique; similar positive intercepts can be observed in Alaskan murre eggs (0.09±0.03, SE, n=45, (Day et al., 2012)) and close inspection of (Blum et al., 2013) study reveal intercept from 0.26±0.05 (SE, n=10) to 0.08±0.03 (SE, n=28) depending on fish species. These positive intercepts contrast with the experimental studies. Only a combination of different reactions (photoreduction, photodemethylation, nuclear volume) with different slopes would be able to generate a shift from the origin in $\Delta^{201}\text{Hg}$ vs. $\Delta^{199}\text{Hg}$ space. Finally, marine mammals feed on different prey items that may have sourced their MMHg from different biogeochemical reservoirs (sediments, water column base line differences) that may have different “end member” $\Delta^{199}\text{Hg}$ and $\Delta^{201}\text{Hg}$ signatures.

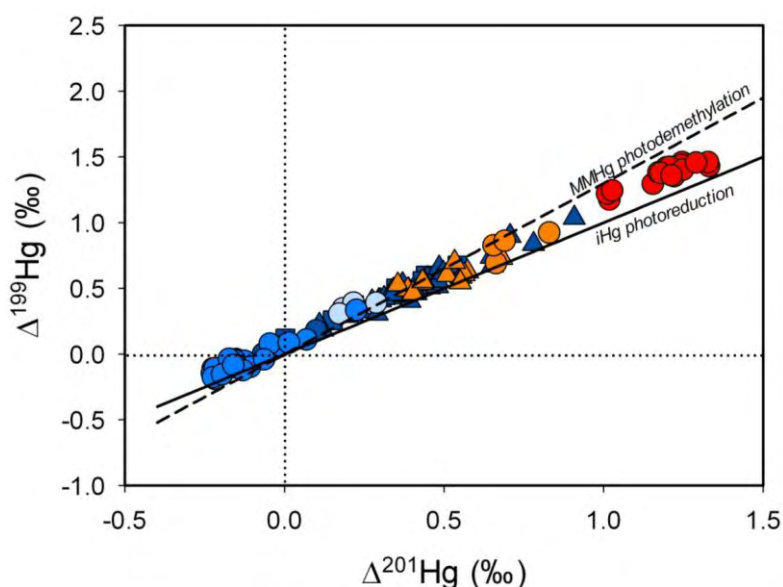


Figure 6: $\Delta^{199}\text{Hg}$ vs $\Delta^{201}\text{Hg}$ relationship observed in all mammal species. Slopes are 1.07±0.01, 1.06±0.04, 0.97±0.03 (SE) for BW, PB and RS respectively. All observations together define a slope of 1.07±0.01.

MDF vs MIF

In addition to $\Delta^{201}\text{Hg}$ vs. $\Delta^{199}\text{Hg}$ diagrams, $\delta^{202}\text{Hg}$ vs $\Delta^{199}\text{Hg}$ relationships (and slopes) provide another level of investigation of the Hg cycle (Figure 7). The same experimental iHg and MMHg photoreduction/photodemethylation studies discussed above have also shown variable $\Delta^{199}\text{Hg}/\delta^{202}\text{Hg}$ slopes (Bergquist and Blum, 2007; Zheng and Hintelmann, 2009). These slopes may help constrain the underlying MDF and MIF mechanisms at play. $\Delta^{199}\text{Hg}/\delta^{202}\text{Hg}$ regression slopes of RS (0.30 ± 0.06 , SE, $r^2=0.31$, $p^*<0.0001$), PB (0.29 ± 0.18 , $r^2=0.17$, $p=0.13$) and BW (0.95 ± 0.05 , $r^2=0.87$, $p^*<0.0001$) have been compared with those obtained experimentally in iHg photoreduction (1.15 ± 0.09 , SE) and MMHg photo (2.43 ± 0.10 , SE) and biological degradation (≈ 0) studies (Bergquist and Blum, 2007; Kritee et al., 2013). In order to understand why the RS, PB and seabird $\Delta^{199}\text{Hg}/\delta^{202}\text{Hg}$ slopes are lower than the experimental iHg and MMHg photochemical slopes, but not BW, we need to reconsider what drives variations in $\delta^{202}\text{Hg}$ and $\Delta^{199}\text{Hg}$ of mammal tissues.

The statistically significant BW $\delta^{202}\text{Hg}$ vs. $\Delta^{199}\text{Hg}$ regression slope (0.95 ± 0.05) is consistent with iHg photoreduction experiments (1.15 ± 0.09 , (Bergquist and Blum, 2007)). We recall that BW $\Delta^{199}\text{Hg}/\Delta^{201}\text{Hg}$ slopes (1.07) were also similar to iHg photoreduction $\Delta^{199}\text{Hg}/\Delta^{201}\text{Hg}$ slopes (1.0). The broad $\delta^{202}\text{Hg}$ and $\Delta^{199}\text{Hg}$ variation in BW livers across the northern Pacific Ocean, Bering Strait and Arctic Ocean therefore seems to be primarily related to Hg photochemistry. Intra-stock variation in BW $\delta^{202}\text{Hg}$ and $\Delta^{199}\text{Hg}$ is best illustrated for the southernmost Cook Inlet stock (Gulf of Alaska habitat) and the northernmost Point Lay stock (Beaufort Sea habitat). Intra-stock variations in $\Delta^{199}\text{Hg}$ are small while intra-stock variation in $\delta^{202}\text{Hg}$ reaches 0.8 ‰. The latter was shown to be mostly related to metabolic MMHg breakdown (Figure 3).

A comparison of RS, PB liver and murre egg observations paints a different picture. For an overall similar $\Delta^{199}\text{Hg}$ range (Figure 7), $\delta^{202}\text{Hg}$ increases from -0.24 ± 0.33 ‰ ($\pm\text{SD}$, $n=39$) in RS, to 0.09 ± 0.31 ‰ ($\pm\text{SD}$, $n=12$) in PB, to 0.51 ± 0.07 ‰ (SD, $n=43$, (Point et al., 2011)) and 0.69 ± 0.07 ‰ (SD, $n=45$, (Day et al., 2012)) in murre eggs. We observed for BW, RS and fresh water seals that hepatic demethylation enriches product iHg in the light isotopes and residual MMHg in the heavy isotopes (Chapter 6 and 7). As light isotope enriched iHg is, in part, rapidly removed from the body in urine, feces and hair shedding, the residual liver MMHg equilibrates with other tissues, including excretion into murre eggs (98% MMHg). It seems therefore possible that the inter-species variation in $\delta^{202}\text{Hg}$ is dictated by the hepatic MMHg demethylation intensity and the different MMHg excretion rates. An alternative or complementary explanation for the $\delta^{202}\text{Hg}$ variations and low $\Delta^{199}\text{Hg}/\delta^{202}\text{Hg}$ slopes in RS, PB and murre eggs could be that the Hg isotopic composition is controlled by mixing of two isotopically contrasting food sources at the local scale. More work is needed to refine these hypotheses.

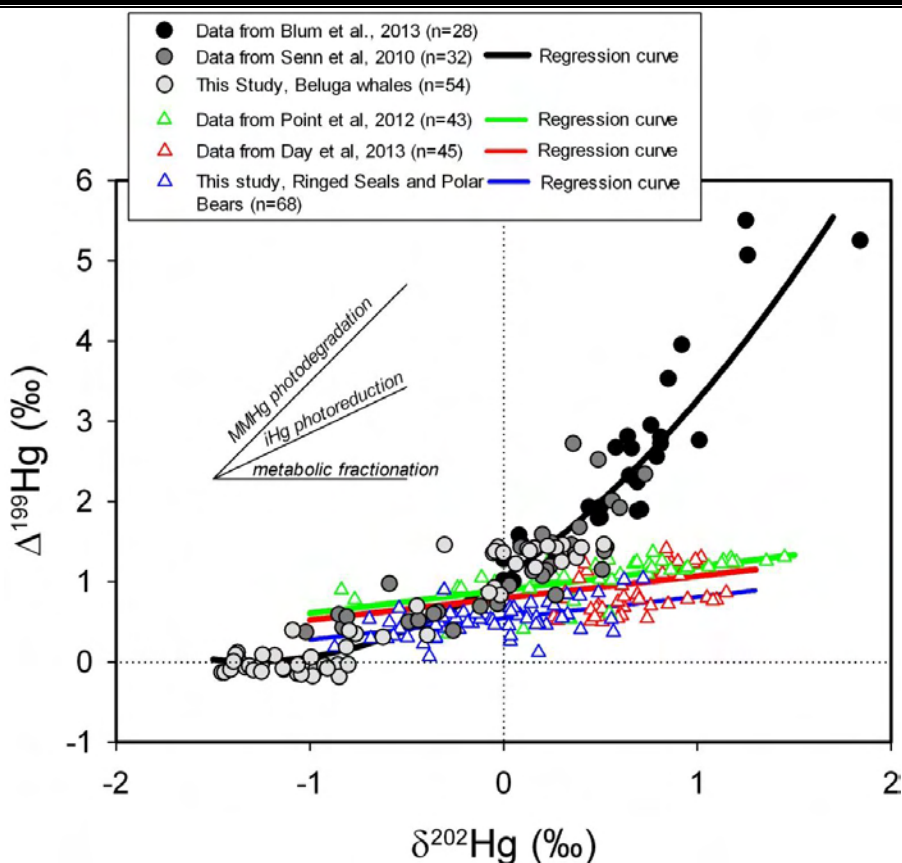


Figure 7: Plot of $\Delta^{199}\text{Hg}$ vs $\delta^{202}\text{Hg}$ obtained in mammal livers (this study), seabird eggs (Day et al., 2012; Point et al., 2011) and fish (Blum et al., 2013; Senn et al., 2010). The theoretical slopes of 2.43 ± 0.10 and 1.15 ± 0.09 found in MMHg and iHg photodegradation experiments (both in 1mg/L freshwater DOC) (Bergquist and Blum, 2007), and the slope close to 0 for MMHg bacterial degradation experiments have been added to the plot.

Bibliography

- AMAP, 2011. AMAP Assessment 2011: Mercury in the Arctic. Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP), Oslo, Norway, xiv + 193 pp.
- Angliss, R.P., Outlaw, R., Wade, P.R., 2001. Alaska marine mammal stock assessments, 2001. US Department of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration, National Marine Fisheries Service, Alaska Fisheries Science Center.
- Arrigo, K.R., van Dijken, G., Pabi, S., 2008. Impact of a shrinking Arctic ice cover on marine primary production. *Geophysical Research Letters*, 35(19).
- Becker, P.R. et al., 2000. Concentrations of Polychlorinated Biphenyls (PCB's), Chlorinated Pesticides, and Heavy Metals and Other Elements in Tissues of Belugas, *Delphinapterus leucas*, from Cook Inlet. *Marine Fisheries Review*, 62(3): p. 81-98.
- Becker, P.R., Standards, N.I.o., Technology, 1991. Alaska Marine Mammal Tissue Archival Project: Revised Collection Protocol. U.S. Department of Commerce, National Institute of Standards and Technology.
- Bergquist, B.A., Blum, J.D., 2007. Mass-Dependent and -Independent Fractionation of Hg Isotopes by Photoreduction in Aquatic Systems. *Science*, 318(5849): 417-420.

- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 37(8): 911-7.
- Blum, J.D., Popp, B.N., Drazen, J.C., Choy, C.A., Johnson, M.W., 2013. Methylmercury production below the mixed layer in the North Pacific Ocean. *Nature geoscience*, 6(10): 879-884.
- Brookens, T.J., Harvey, J.T., O'Hara, T.M., 2007. Trace element concentrations in the Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardii*) in central and northern California. *Science of The Total Environment*, 372(2-3): 676-692.
- Brookens, T.J., O'Hara, T.M., Taylor, R.J., Bratton, G.R., Harvey, J.T., 2008. Total mercury body burden in Pacific harbor seal, *Phoca vitulina richardii*, pups from central California. *Marine Pollution Bulletin*, 56(1): 27-41.
- Caurant, F., Navarro, M., Amiard, J.-C., 1996. Mercury in pilot whales: possible limits to the detoxification process. *Science of The Total Environment*, 186(1-2): 95-104.
- Citta, J.J., Suydam, R.S., Quakenbush, L.T., Frost, K.J., O'Corry-Crowe, G.M., 2013. Dive Behavior of Eastern Chukchi Beluga Whales (*Delphinapterus leucas*), 1998-2008. *Arctic*, 66(4): 389-406.
- Crawford, J., Frost, K., Quakenbush, L., Whiting, A., 2012. Different habitat use strategies by subadult and adult ringed seals (*Phoca hispida*) in the Bering and Chukchi seas. *Polar Biology*, 35(2): 241-255.
- Day, R.D. et al., 2012. Mercury Stable Isotopes in Seabird Eggs Reflect a Gradient from Terrestrial Geogenic to Oceanic Mercury Reservoirs. *Environmental Science & Technology*, 46(10): 5327-5335.
- Dehn, L.-A. et al., 2006. Trophic relationships in an Arctic food web and implications for trace metal transfer. *Science of The Total Environment*, 362(1-3): 103-123.
- Dehn, L.-A. et al., 2007. Feeding ecology of phocid seals and some walrus in the Alaskan and Canadian Arctic as determined by stomach contents and stable isotope analysis. *Polar Biology*, 30(2): 167-181.
- Derocher, A.E., Wiig, Ø., Andersen, M., 2002. Diet composition of polar bears in Svalbard and the western Barents Sea. *Polar Biology*, 25(6): 448-452.
- Eagles-Smith, C.A., Ackerman, J.T., Yee, J., Adelsbach, T.L., 2009. Mercury demethylation in waterbird livers: dose-response thresholds and differences among species. *Environ Toxicol Chem*, 28(3): 568-577.
- Fetterer, F., Knowles, K., Meier, W., Savoie, M., 2002. Sea ice index. Natl Snow and Ice Data Center, Boulder, CO) Available at <http://nsidc.org/data/g02135.htm>. Accessed February, 9: 2009.
- Frost, K., Lowry, L., 1990. Distribution, abundance, and movements of beluga whales, *Delphinapterus leucas*, in coastal waters of western Alaska. *Advances in research on the beluga whale, Delphinapterus leucas*. *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci*, 224: 39-57.
- Gaden, A., Ferguson, S.H., Harwood, L., Melling, H., Stern, G.A., 2009. Mercury Trends in Ringed Seals (*Phoca hispida*) from the Western Canadian Arctic since 1973: Associations with Length of Ice-Free Season. *Environmental Science & Technology*, 43(10): 3646-3651.
- Gaden, A., Stern, G.A., 2010. Temporal Trends in Beluga, Narwhal and Walrus Mercury Levels: Links to Climate Change. In: Ferguson, S., Loseto, L., Mallory, M. (Eds.), *A Little Less Arctic*. Springer Netherlands, pp. 197-216.
- 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. *Environmental Science & Technology*, 45(4): 1264-1270.

- Hammerschmidt, C.R., Fitzgerald, W.F., 2006. Methylmercury cycling in sediments on the continental shelf of southern New England. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70(4): 918-930.
- Hammerschmidt, C.R., Fitzgerald, W.F., Lamborg, C.H., Balcom, P.H., Visscher, P.T., 2004. Biogeochemistry of methylmercury in sediments of Long Island Sound. *Marine Chemistry*, 90(1): 31-52.
- Harwood, L.A., Smith, T.G., Auld, J.C., 2012. Fall migration of ringed seals (*Phoca hispida*) through the Beaufort and Chukchi seas, 2001–02. *Arctic*, 65: 35-44.
- Heimbürger, L.-E. et al., 2010. Methyl mercury distributions in relation to the presence of nano- and picophytoplankton in an oceanic water column (Ligurian Sea, North-western Mediterranean). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74(19): 5549-5559.
- Hobbs, R., Laidre, K., Vos, D., Mahoney, B., Eagleton, M., 2005. Movements and Area Use of Belugas, *Delphinapterus leucas*, in a Subarctic Alaskan Estuary. *Arctic*, 58(4).
- Kritee, K., Blum, J.D., Reinfelder, J.R., Barkay, T., 2013. Microbial stable isotope fractionation of mercury: A synthesis of present understanding and future directions. *Chemical Geology*, 336(0): 13-25.
- Kwon, S.Y. et al., 2012. Absence of Fractionation of Mercury Isotopes during Trophic Transfer of Methylmercury to Freshwater Fish in Captivity. *Environmental Science & Technology*, 46(14): 7527-7534.
- Laffont, L. et al., 2009. Anomalous Mercury Isotopic Compositions of Fish and Human Hair in the Bolivian Amazon. *Environmental Science & Technology*, 43(23): 8985-8990.
- Larose, C. et al., 2011. Bioavailable mercury cycling in polar snowpacks. *Environmental Science & Technology*, 45(6): 2150-2156.
- Lockhart, W.L. et al., 2005. Concentrations of mercury in tissues of beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from several communities in the Canadian Arctic from 1981 to 2002. *Science of The Total Environment*, 351–352(0): 391-412.
- Lønø, O., Polarinstittutt, N., 1970. The polar bear (*Ursus maritimus* Phipps) in the Svalbard area. Norsk Polarinstittutt.
- Loseto, L., Richard, P., Stern, G., Orr, J., Ferguson, S., 2006. Segregation of Beaufort Sea beluga whales during the open-water season. *Canadian Journal of Zoology*, 84(12): 1743-1751.
- Masbou J. et al., In prep. Hg stable isotope time trends in ringed seal register decreasing sea ice cover in the Alaskan Arctic *Environmental Science & Technology*.
- Maslanik, J. et al., 2007. A younger, thinner Arctic ice cover: Increased potential for rapid, extensive sea-ice loss. *Geophysical Research Letters*, 34(24).
- Mason, R.P. et al., 2012. Mercury biogeochemical cycling in the ocean and policy implications. *Environmental Research*, 119(0): 101-117.
- Mckeown-Eyssen, G.E., Ruedy, J., Neims, A., 1983. Methyl mercury exposure in northern Quebec: II. Neurologic findings in children. *American journal of epidemiology*, 118(4): 470-479.
- Monperrus, M., Rodriguez Martin-Doimeadios, R.C., Scancar, J., Amouroux, D., Donard, O.F.X., 2003. Simultaneous Sample Preparation and Species-Specific Isotope Dilution Mass Spectrometry Analysis of Monomethylmercury and Tributyltin in a Certified Oyster Tissue. *Analytical Chemistry*, 75(16): 4095-4102.
- O'Corry-Crowe, G., Suydam, R., Rosenberg, A., Frost, K., Dizon, A., 1997. Phylogeography, population structure and dispersal patterns of the beluga whale *Delphinapterus leucas* in the western Nearctic revealed by mitochondrial DNA. *Molecular Ecology*, 6(10): 955-970.
- O'Corry-Crowe, G.M., Dizon, A.E., Suydam, R., Lowry, L.F., 2002. Molecular genetic studies of population structure and movement patterns in a migratory species: the beluga whale,

- Delphinapterus leucas, in the western Nearctic. Molecular and cell biology of marine mammals. Krieger Publishing Company, Malabar, FL: 53-64.
- Pauly, D., Trites, A., Capuli, E., Christensen, V., 1998. Diet composition and trophic levels of marine mammals. ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil, 55(3): 467-481.
- Perrot, V. et al., In Prep. Hg stable isotope fractionation reflects internal methylmercury demethylation in aquatic mammals.
- Point, D. et al., 2011. Methylmercury photodegradation influenced by sea-ice cover in Arctic marine ecosystems. Nature Geosci, 4(3): 188-194.
- Post, D.M., 2002. Using stable isotopes to estimate trophic position : Models, methods, and assumptions. Ecology, 83(3): 703-718.
- Ramos, R., González-Solís, J., 2012. Trace me if you can: the use of intrinsic biogeochemical markers in marine top predators. Frontiers in Ecology and the Environment, 10(5): 258-266.
- Schell, D.M., Barnett, B.A., Vinette, K.A., 1998. Carbon and nitrogen isotope ratios in zooplankton of the Bering, Chukchi and Beaufort seas. Marine Ecology Progress Series, 162(12): 11-23.
- Schroeder, W.H., Munthe, J., 1998. Atmospheric mercury—An overview. Atmospheric Environment, 32(5): 809-822.
- Senn, D.B. et al., 2010. Stable Isotope (N, C, Hg) Study of Methylmercury Sources and Trophic Transfer in the Northern Gulf of Mexico. Environmental Science & Technology, 44(5): 1630-1637.
- Smith, T.G., 1980. Polar bear predation of ringed and bearded seals in the land-fast sea ice habitat. Canadian Journal of Zoology, 58(12): 2201-2209.
- Smith, T.G., Armstrong, F., 1975. Mercury in seals, terrestrial carnivores, and principal food items of the Inuit, from Holman, NWT. Journal of the Fisheries Board of Canada, 32(6): 795-801.
- Stern, G.A. et al., 2012. How does climate change influence arctic mercury? Science of The Total Environment, 414(0): 22-42.
- Stirling, I., Archibald, W.R., 1977. Aspects of predation of seals by polar bears. Journal of the Fisheries Board of Canada, 34(8): 1126-1129.
- Sunderland et al., 2009. Mercury sources, distribution, and bioavailability in the North Pacific Ocean: Insights from data and models, 23. American Geophysical Union, Washington, DC, ETATS-UNIS.
- Suydam, R.S., Lowry, L.F., Frost, K.J., 2005. Distribution and movements of beluga whales from the eastern Chukchi Sea stock during summer and early autumn. OCS Study MMS, 35: 35.
- Tillander, M., Miettinen, J.K., Koivisto, I., 1970. Excretion rate of methyl mercury in the seal (*Pusa hispida*). Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Wagemann, R., Trebacz, E., Boila, G., Lockhart, W.L., 2000. Mercury species in the liver of ringed seals. Science of The Total Environment, 261(1-3): 21-32.
- Yin, R., Feng, X., Shi, W., 2010. Application of the stable-isotope system to the study of sources and fate of Hg in the environment: A review. Applied Geochemistry, 25(10): 1467-1477.
- Zheng, W., Hintelmann, H., 2009. Mercury isotope fractionation during photoreduction in natural water is controlled by its Hg/DOC ratio. Geochimica et Cosmochimica Acta, 73(22): 6704-6715.
- Zheng, W., Hintelmann, H., 2010. Isotope fractionation of mercury during its photochemical reduction by low-molecular-weight organic compounds. The Journal of Physical Chemistry A, 114(12): 4246-4253.

Supporting information:

Hg stable isotopic composition in Alaskan Marine Mammals

*Jérémy Masbou^{*1}, David Point¹, Jeroen E. Sonke¹, Paul R. Becker²*

¹Observatoire Midi-Pyrénées, Laboratoire Géosciences Environnement Toulouse, CNRS/IRD/Université Paul Sabatier Toulouse 3, 14 avenue Edouard Belin, 31400 Toulouse.

²National Institute of Standards and Technology, Analytical Chemistry Division, Hollings Marine Laboratory, 331 Fort Johnson Road, Charleston, South Carolina 29412 USA.

RECEIVED DATE

*Author for correspondence: jeremy.masbou@get.obs-mip.fr

Phone: +33 (0)5 61 33 26 07

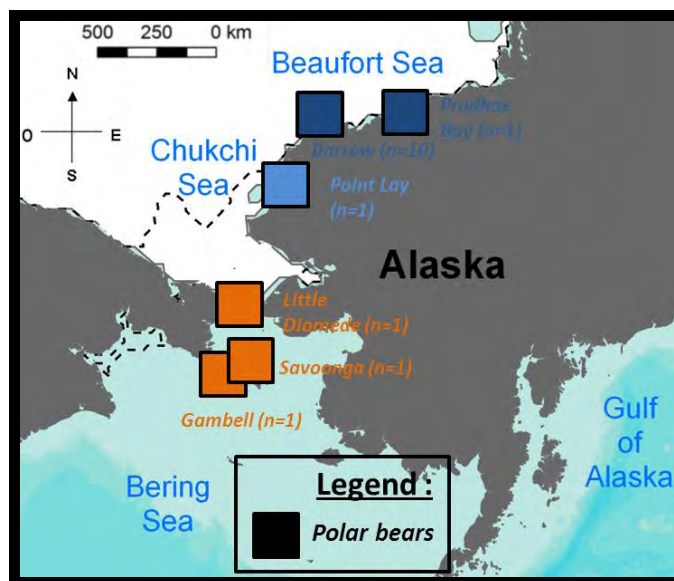


Figure S1: Map of polar bear sampling locations.

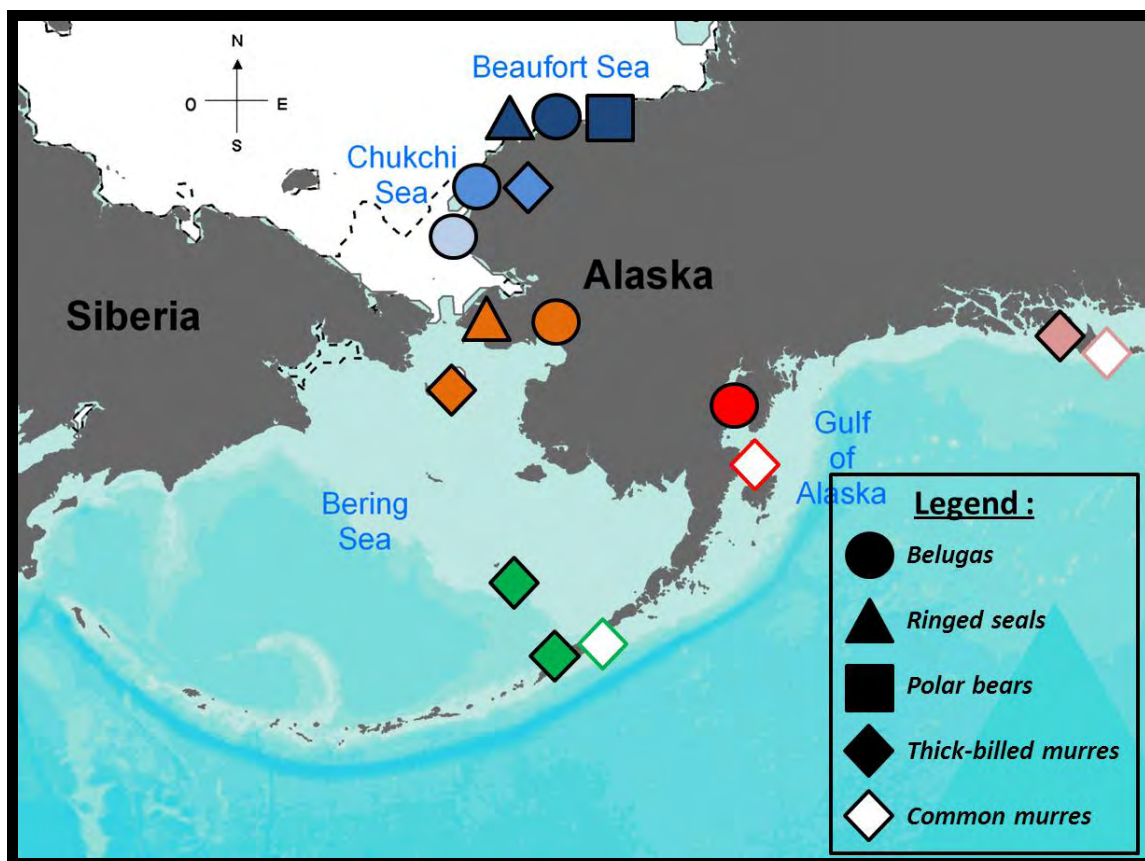


Figure S2: Sampling location of mammals (this study) and seabirds (Point et al., 2011) where $n_{samples} > 1$.

Chapitre 5. Variation des signatures isotopiques du Hg dans les foies de mammifères marins de l'Alaska

Table S1: Overview of the isotopic (Hg, C, N) and Hg speciation results from the 55 beluga whale and 15 polar bear livers.

Specie	NBSB ID NO.	Animal ID NO.	Year	Location	Sex	Age	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	[HgT]	SD	n	$\delta^{199}\text{Hg}$	2SD	$\delta^{200}\text{Hg}$	2SD	$\delta^{201}\text{Hg}$	2SD	$\delta^{202}\text{Hg}$	2SD	$\Delta^{199}\text{Hg}$	2SD	$\Delta^{200}\text{Hg}$	2SD	$\Delta^{201}\text{Hg}$	2SD
							(‰)	(‰)	($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	(‰)	(‰)	(‰)	(‰)	(‰)	(‰)	(‰)	(‰)	(‰)	(‰)	(‰)	(‰)	(‰)	(‰)	(‰)
Beluga Whale	MM13L720G	692-BLKA-056	1997	Barrow	M		-19.27	18.24	5.16	0.13	1	-0.02	0.10	-0.41	0.07	-0.51	0.12	-0.81	0.14	0.18	0.10	0.00	0.04	0.10	0.10
	MM13L715	692-BLKA-054	1997	Barrow	M		-18.42	18.60	13.85	0.63	1	-0.23	0.10	-0.62	0.07	-0.92	0.12	-1.24	0.14	0.09	0.10	0.00	0.04	0.01	0.10
	MM13L717G	692-BLKA-055	1998	Barrow	M		-19.64	18.40	8.73	0.19	1	-0.19	0.10	-0.51	0.07	-0.76	0.12	-0.99	0.14	0.06	0.10	-0.01	0.04	-0.02	0.10
	MM15L118C	692-BLKA-067	1999	Barrow	M		-18.76	17.70	5.01	0.17	1	-0.35	0.10	-0.69	0.07	-1.12	0.12	-1.39	0.14	0.00	0.10	0.01	0.04	-0.07	0.10
	MM04L134	692-BLKA-008	1990	Point Lay	M	13	-18.35	17.67	4.25	0.18	1	-0.31	0.10	-0.65	0.07	-1.07	0.12	-1.37	0.14	0.04	0.10	0.04	0.04	-0.03	0.10
	MM04L140	692-BLKA-010	1990	Point Lay	M	23	-18.33	17.61	46.20	1.42	1	-0.41	0.10	-0.70	0.07	-1.13	0.12	-1.33	0.14	-0.07	0.10	-0.03	0.04	-0.13	0.10
	MM04L128	692-BLKA-006	1990	Point Lay	M	5	-19.19	18.65	38.41	2.05	1	-0.50	0.10	-0.72	0.07	-1.30	0.12	-1.46	0.14	-0.13	0.10	0.01	0.04	-0.20	0.10
	MM04L131	692-BLKA-007	1990	Point Lay	F	43	-19.52	17.83	78.00	0.93	1	-0.25	0.10	-0.40	0.07	-0.80	0.12	-0.86	0.14	-0.04	0.10	0.03	0.04	-0.15	0.10
	MM04L125	692-BLKA-005	1990	Point Lay	M	30	-17.73	17.97	29.12	2.13	1	-0.38	0.10	-0.65	0.07	-1.11	0.12	-1.31	0.14	-0.05	0.10	0.00	0.04	-0.13	0.10
	MM04L146	692-BLKA-012	1990	Point Lay	F	55	-18.92	17.84	28.33	1.05	1	-0.36	0.10	-0.51	0.07	-0.96	0.12	-0.97	0.14	-0.11	0.10	-0.02	0.04	-0.23	0.10
	MM04L143	692-BLKA-011	1990	Point Lay	M	28	-18.62	18.07	44.64	1.50	1	-0.37	0.10	-0.58	0.07	-1.10	0.12	-1.25	0.14	-0.04	0.10	0.04	0.04	-0.16	0.10
	MM04L149	692-BLKA-013	1990	Point Lay	M	26	-16.90	18.85	33.55	1.36	1	-0.50	0.10	-0.74	0.07	-1.28	0.12	-1.44	0.14	-0.13	0.10	-0.02	0.04	-0.20	0.10
	MM04L137	692-BLKA-009	1990	Point Lay	M	13	-18.40	17.43	11.56	0.49	1	-0.45	0.10	-0.70	0.07	-1.21	0.12	-1.41	0.14	-0.10	0.10	0.01	0.04	-0.15	0.10
	MM11L420	692-BLKA-043	1996	Point Lay	M	35	-19.73	18.15	70.00	2.47	1	-0.41	0.10	-0.56	0.07	-1.03	0.12	-1.07	0.14	-0.14	0.10	-0.02	0.04	-0.23	0.10
	MM11L424	692-BLKA-044	1996	Point Lay	M	46	-19.11	18.79	119.32	8.27	1	-0.40	0.10	-0.46	0.07	-0.86	0.12	-0.85	0.14	-0.19	0.10	-0.03	0.04	-0.22	0.10
	MM11L432	692-BLKA-046	1996	Point Lay	M	28	-19.69	17.87	20.00	0.67	2	-0.38	0.10	-0.63	0.07	-0.96	0.12	-1.14	0.14	-0.10	0.10	-0.05	0.04	-0.11	0.10
	MM11L436	692-BLKA-040	1996	Point Lay	M	14	-18.64	17.42	5.75	0.33	2	-0.23	0.10	-0.72	0.07	-0.97	0.12	-1.37	0.14	0.11	0.10	-0.03	0.04	0.07	0.10
	MM11L444	692-BLKA-042	1996	Point Lay	F	34	-19.25	17.61	52.99	3.74	1	-0.28	0.10	-0.45	0.07	-0.85	0.12	-0.92	0.14	-0.05	0.10	0.01	0.04	-0.16	0.10
	MM11L440	692-BLKA-041	1996	Point Lay	F	12	-18.94	17.72	6.92	0.14	1	-0.22	0.10	-0.61	0.07	-0.94	0.12	-1.18	0.14	0.08	0.10	-0.01	0.04	-0.05	0.10
	MM11L448	692-BLKA-047	1996	Point Lay	F	33	-19.63	17.48	38.77	1.67	1	-0.43	0.10	-0.64	0.07	-1.19	0.12	-1.29	0.14	-0.11	0.10	0.00	0.04	-0.22	0.10
	MM11L455	692-BLKA-048	1996	Point Lay	F	44	-18.62	17.91	110.89	10.69	1	-0.24	0.10	-0.39	0.07	-0.78	0.12	-0.80	0.14	-0.04	0.10	0.02	0.04	-0.17	0.10
	MM11L459	692-BLKA-049	1996	Point Lay	F	16	-18.99	17.51	9.78	0.45	1	-0.26	0.10	-0.69	0.07	-1.03	0.12	-1.38	0.14	0.09	0.10	0.01	0.04	0.01	0.10
	MM15L055C	692-BLKA-058	1999	Point Lay	M		-19.03	17.67	108.11	8.54	1	-0.42	0.10	-0.49	0.07	-0.97	0.12	-0.99	0.14	-0.18	0.10	0.00	0.04	-0.23	0.10
	MM15L109C	692-BLKA-057	1999	Point Lay	M		-18.94	18.20	39.93	1.37	1	-0.37	0.10	-0.58	0.07	-1.01	0.12	-1.14	0.14	-0.08	0.10	0.00	0.04	-0.15	0.10
	MM15L061C	692-BLKA-061	1999	Point Lay	M		-18.62	18.40	117.34	7.68	1	-0.42	0.10	-0.51	0.07	-0.98	0.12	-1.05	0.14	-0.15	0.10	0.02	0.04	-0.20	0.10
	MM15L070C	692-BLKA-065	1999	Point Lay	M		-19.12	17.97	11.68	0.38	1	-0.31	0.10	-0.61	0.07	-0.86	0.12	-1.06	0.14	-0.04	0.10	-0.07	0.04	-0.06	0.10
	MM15L058C	692-BLKA-059	1999	Point Lay	M		-18.84	18.17	1.32	0.08	1	0.24	0.10	-0.22	0.07	-0.07	0.12	-0.39	0.14	0.34	0.10	-0.02	0.04	0.22	0.10

Chapitre 5. Variation des signatures isotopiques du Hg dans les foies de mammifères marins de l'Alaska

MM15L112C	692-BLKA-060	1999	Point Lay	M		-18.47	18.26	56.44	2.17	1	-0.44	0.10	-0.62	0.07	-1.07	0.12	-1.25	0.14	-0.12	0.10	0.01	0.04	-0.13	0.10	
MM15L064C	692-BLKA-062	1999	Point Lay	M		-18.27	18.36	16.31	0.68	2	-0.31	0.10	-0.43	0.07	-0.84	0.12	-0.91	0.14	-0.08	0.10	0.02	0.04	-0.16	0.10	
MM03L077	692-BLKA-004	1989	Point Hope	M	11	-17.98	17.75	1.62	0.12	2	0.12	0.10	-0.54	0.07	-0.53	0.12	-1.09	0.14	0.39	0.10	0.00	0.04	0.29	0.10	
MM03L075	692-BLKA-003	1989	Point Hope	F	20	-18.38	17.00	12.37	0.98	1	0.16	0.10	-0.36	0.07	-0.39	0.12	-0.76	0.14	0.35	0.10	0.02	0.04	0.18	0.10	
MM03L072	692-BLKA-002	1989	Point Hope	F	9	-18.29	16.81	1.67	0.18	1	0.19	0.10	-0.45	0.07	-0.38	0.12	-0.80	0.14	0.39	0.10	-0.05	0.04	0.22	0.10	
MM03L069	692-BLKA-001	1989	Point Hope	F	16	-17.73	17.26	4.27	0.40	1	0.15	0.10	-0.28	0.07	-0.30	0.12	-0.62	0.14	0.31	0.10	0.03	0.04	0.17	0.10	
MM16L240C	692-BLKA-072	2000	Norton Sound	M		-17.85	19.35	2.90	0.20	1	0.58	0.10	-0.18	0.07	0.33	0.12	-0.45	0.14	0.69	0.10	0.04	0.04	0.66	0.10	
MM16L232C	692-BLKA-069	2000	Norton Sound	M		-18.65	19.20	0.75	0.02	3	0.91	0.09	-0.02	0.08	0.79	0.07	-0.05	0.09	0.92	0.12	0.01	0.04	0.83	0.14	
MM16L235C	692-BLKA-070	2000	Norton Sound	F		-17.85	19.30	3.67	0.20	1	0.82	0.10	0.02	0.07	0.64	0.12	-0.02	0.14	0.83	0.10	0.02	0.04	0.65	0.10	
MM16L237C	692-BLKA-071	2000	Norton Sound	F		-18.73	19.21	0.44	0.04	4	0.84	0.15	0.02	0.04	0.63	0.19	-0.07	0.07	0.86	0.14	0.05	0.02	0.69	0.17	
MM10L386	692-BLKA-029	1995	Cook Inlet	M		-19.23	14.27	3.97	0.25	2	1.54	0.10	0.18	0.07	1.48	0.12	0.31	0.14	1.46	0.10	0.03	0.04	1.25	0.10	
MM06L216	692-BLKA-015	1992	Cook Inlet	M		-18.79	14.98	2.68	0.00	1	1.49	0.10	0.20	0.07	1.40	0.12	0.27	0.14	1.42	0.10	0.06	0.04	1.20	0.10	
MM10L342	692-BLKA-024	1995	Cook Inlet	F		-18.60	16.75	1.97	0.03	1	1.39	0.10	0.25	0.07	1.44	0.12	0.38	0.14	1.30	0.10	0.06	0.04	1.15	0.10	
MM10L333	692-BLKA-021	1995	Cook Inlet	M		-18.89	16.18	11.42	0.00	1	1.34	0.10	0.00	0.07	1.18	0.12	-0.05	0.14	1.35	0.10	0.02	0.04	1.22	0.10	
MM10L368	692-BLKA-026	1995	Cook Inlet	M		-18.81	16.20	5.51	0.27	1	1.46	0.10	0.13	0.07	1.33	0.12	0.16	0.14	1.42	0.10	0.05	0.04	1.21	0.10	
MM10L339	692-BLKA-023	1995	Cook Inlet	F		-17.74	16.79	5.03	0.15	1	1.22	0.10	0.12	0.07	1.14	0.12	0.16	0.14	1.18	0.10	0.03	0.04	1.02	0.10	
MM10L336	692-BLKA-022	1995	Cook Inlet	F		-18.46	16.16	2.57	0.00	1	1.42	0.10	0.06	0.07	1.31	0.12	-0.03	0.14	1.43	0.10	0.08	0.04	1.33	0.10	
MM10L331	692-BLKA-020	1995	Cook Inlet	F		-16.01	16.25	0.70	0.00	3	1.24	0.18	0.06	0.17	1.06	0.07	0.06	0.18	1.22	0.13	0.03	0.08	1.01	0.04	
MM10L374	692-BLKA-028	1995	Cook Inlet	M		-19.00	16.60	3.37	0.37	2	1.50	0.10	0.16	0.07	1.42	0.12	0.23	0.14	1.44	0.10	0.05	0.04	1.24	0.10	
MM10L371	692-BLKA-027	1995	Cook Inlet	M		-18.39	16.89	3.99	0.14	1	1.53	0.10	0.23	0.07	1.51	0.12	0.40	0.14	1.42	0.10	0.03	0.04	1.21	0.10	
MM11L416	692-BLKA-031	1996	Cook Inlet	F		-17.80	16.67	4.23	0.32	1	1.32	0.10	0.15	0.07	1.25	0.12	0.30	0.14	1.25	0.10	0.00	0.04	1.03	0.10	
MM11L463	692-BLKA-033	1996	Cook Inlet	F		-19.01	14.26	4.09	0.23	1	1.44	0.10	0.12	0.07	1.34	0.12	0.12	0.14	1.40	0.10	0.06	0.04	1.25	0.10	
MM11L467	692-BLKA-032	1996	Cook Inlet	F		-18.99	14.95	5.24	0.06	1	1.42	0.10	0.06	0.07	1.27	0.12	0.14	0.14	1.38	0.10	-0.01	0.04	1.17	0.10	
MM11L477	692-BLKA-034	1996	Cook Inlet	F		-19.09	14.34	6.52	0.32	1	1.37	0.10	0.04	0.07	1.15	0.12	-0.04	0.14	1.38	0.10	0.06	0.04	1.18	0.10	
MM11L481	692-BLKA-035	1996	Cook Inlet	M		-18.78	15.58	12.24	0.37	1	1.38	0.10	-0.11	0.07	1.06	0.12	-0.31	0.14	1.46	0.10	0.04	0.04	1.29	0.10	
MM11L488	692-BLKA-037	1996	Cook Inlet	M		-19.08	15.58	4.48	0.13	1	1.36	0.10	0.03	0.07	1.21	0.12	0.00	0.14	1.36	0.10	0.03	0.04	1.21	0.10	
MM10L345	692-BLKA-025	1996	Cook Inlet	F	0	-16.42	18.33	0.46	0.02	3	1.59	0.13	0.29	0.11	1.72	0.17	0.52	0.02	1.46	0.13	0.03	0.11	1.33	0.15	
Polar Bear	MM11L530	692-PLBR-006	1996	Barrow	F	8	-19.44	22.07	11.34	0.41	1	0.67	0.10	0.25	0.07	0.88	0.12	0.56	0.14	0.53	0.10	-0.02	0.04	0.46	0.10
	MM11L533	692-PLBR-007	1996	Barrow	F		-19.91	21.59	9.48	0.01	1	0.63	0.10	0.05	0.07	0.53	0.12	0.12	0.14	0.60	0.10	-0.01	0.04	0.44	0.10

Chapitre 5. Variation des signatures isotopiques du Hg dans les foies de mammifères marins de l'Alaska

MM11L536	692-PLBR-008	1996	Barrow	F		-19.78	21.47	6.02	0.05	1	0.68	0.10	0.17	0.07	0.72	0.12	0.33	0.14	0.59	0.10	0.00	0.04	0.47	0.10
MM11L539	692-PLBR-001	2000	Barrow	M		-19.50	20.28	15.68	0.23	1	0.16	0.10	0.10	0.07	0.14	0.12	0.18	0.14	0.12	0.10	0.01	0.04	0.00	0.10
MM11L542	692-PLBR-002	2000	Barrow	M		-19.88	21.56	10.24	0.37	1	0.46	0.10	0.01	0.07	0.39	0.12	0.03	0.14	0.45	0.10	-0.01	0.04	0.37	0.10
MM11L568	692-PLBR-015	1996	Barrow	F		-19.38	19.56	4.04	0.15	1	0.68	0.10	0.02	0.07	0.57	0.12	0.03	0.14	0.67	0.10	0.01	0.04	0.54	0.10
MM11L571	692-PLBR-016	2000	Barrow	M	12	-20.49	nc	27.90	0.37	1	0.27	0.10	0.01	0.07	0.18	0.12	0.03	0.14	0.26	0.10	0.00	0.04	0.15	0.10
MM11L574	692-PLBR-017	2000	Barrow	M		-20.82	20.15	13.56	0.15	2	0.37	0.10	-0.26	0.07	-0.04	0.12	-0.52	0.14	0.50	0.10	0.00	0.04	0.35	0.10
MM11L577	692-PLBR-010	1996	Barrow	F		-19.94	22.07	11.65	0.70	1	0.60	0.10	0.07	0.07	0.56	0.12	0.17	0.14	0.56	0.10	-0.01	0.04	0.43	0.10
MM12L644	692-PLBR-028	2001	Barrow	M	19	-19.12	21.95	14.85	0.20	1	0.51	0.10	0.30	0.07	0.64	0.12	0.57	0.14	0.37	0.10	0.01	0.04	0.22	0.10
MM18L338C	692-PLBR-056	2002	Gambell	M	11	-19.08	18.37	5.08	0.16	1	0.98	0.10	0.28	0.07	1.10	0.12	0.49	0.14	0.86	0.10	0.04	0.04	0.73	0.10
MM17L311C	692-PLBR-053	2001	Little Diomedé	F	5	-19.80	20.35	7.07	0.00	1	1.18	0.10	0.36	0.07	1.29	0.12	0.62	0.14	1.02	0.10	0.05	0.04	0.82	0.10
MM12L632	692-PLBR-022	2001	Point Lay	M	2	-18.98	21.48	5.58	0.12	1	0.51	0.10	-0.03	0.07	0.30	0.12	-0.07	0.14	0.53	0.10	0.00	0.04	0.35	0.10
MM16L151C	692-PLBR-047	1999	Prudhoe Bay	F	14	-21.62	21.41	53.76	0.83	1	0.34	0.10	-0.13	0.07	0.07	0.12	-0.32	0.14	0.42	0.10	0.03	0.04	0.31	0.10
MM15L140C	692-PLBR-045	1999	Savoonga	F	11	-20.00	20.98	3.51	0.07	1	0.92	0.10	0.20	0.07	0.96	0.12	0.39	0.14	0.82	0.10	0.00	0.04	0.67	0.10

Chapitre 6. L'étude de la composition isotopique des différentes formes chimiques du mercure dans les tissus de mammifères aquatiques permet d'établir le lien entre l'exposition au méthylmercure et la réponse métabolique

Table S2: Regional comparison of $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, and Hg concentrations in polar bear, beluga whales and ringed seal livers.

Mammal	Location	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	Age (year)	[HgT] ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Reference
Polar Bear <i>Ursus Maritimus</i>	Barrow Alaska	-18.4±1.1 n=10	20.6±0.6 n=10	10.6±8.7 Range : 2-29 n=11	14.01±12.53 Range : 1.50-54.26 n=23	(Dehn et al., 2006)
	Barrow Alaska	-19.8±0.5 n=10	21.2±0.9 n=9	13.0±5.6 Range : 8-19 n=3	12.48±6.53 Range : 4.04-27.90 n=10	This study
Beluga whale <i>Delphinapterus leucas</i>	Point Hope, Point Lay Alaska	-18.4±0.6 n=49	16.5±0.6 n=49	- - -	15.95±15.17 Range : 0.28-72.48 n=48	(Dehn et al., 2006)
	Point Hope, Point Lay Alaska			24.4±14.7 Range : 9-55 n=10	30.51±27.68 Range : 1.40-72.90 n=10	(Becker et al., 1995b)
Ringed seal <i>Phoca Hispida</i>	Barrow, Point Lay, Point Hope Alaska	-18.7±0.6 n=33	17.9±0.5 n=33	25.2±13.7 Range : 5-55 n=22	34.92±36.16 Range : 1.32-119.32 n=33	This study
	Barrow Alaska	-18.5±0.8 n=78	16.9±0.6 n=78	6.6±6.5 Range : 0-27 n=79	2.47±3.15 Range : 0.06-16.55 n=64	(Dehn et al., 2006)
	Barrow Alaska	-18.6±0.8 n=41	17.0±1.0 n=41	5.0±4.3 Range : 1-17 n=38	3.06±3.68 Range : 0.09-13.93 n=41	This study

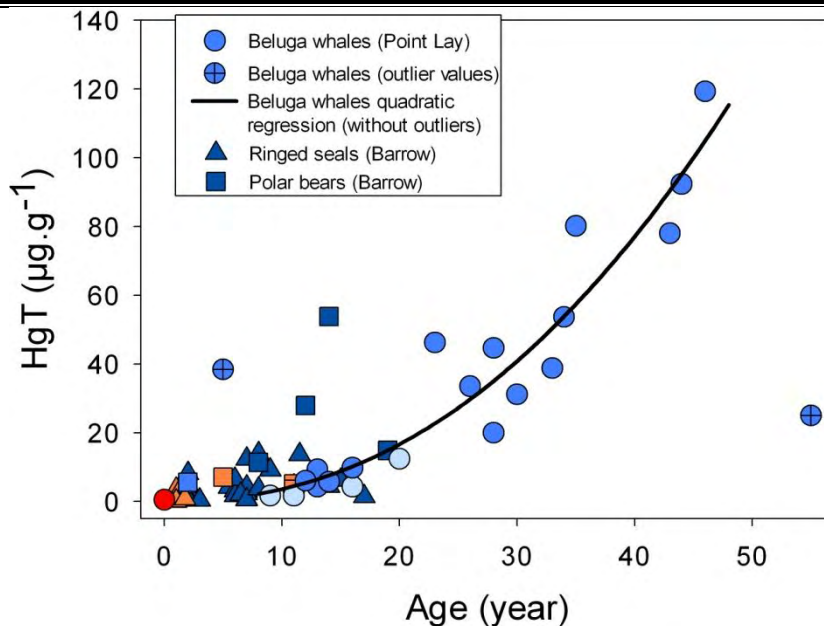


Figure S3: Evolution of total Hg concentration with the age of beluga whales (circles) ringed seals (triangles) and polar bears (squares). The colour of markers follows the sampling location colour code displayed in Figure S1. The line represents the quadratic regression curve for Point Lay beluga whales (except two outliers marked by '+', $r^2=0.89$, $p^*<0.001$, $n=16$).

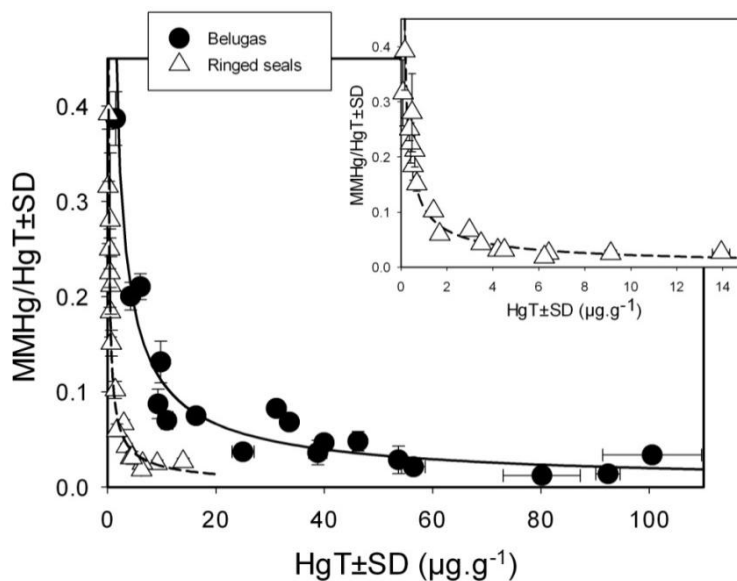


Figure S4: Evolution of the MMHg/HgT fraction with HgT concentration of ringed seals and beluga whales. Zoom of ringed seal plot is displayed in the top-right corner of the Figure. Best non-linear fits have been determined using DataFit® software developed by Oakdale Engineering (PA, USA).

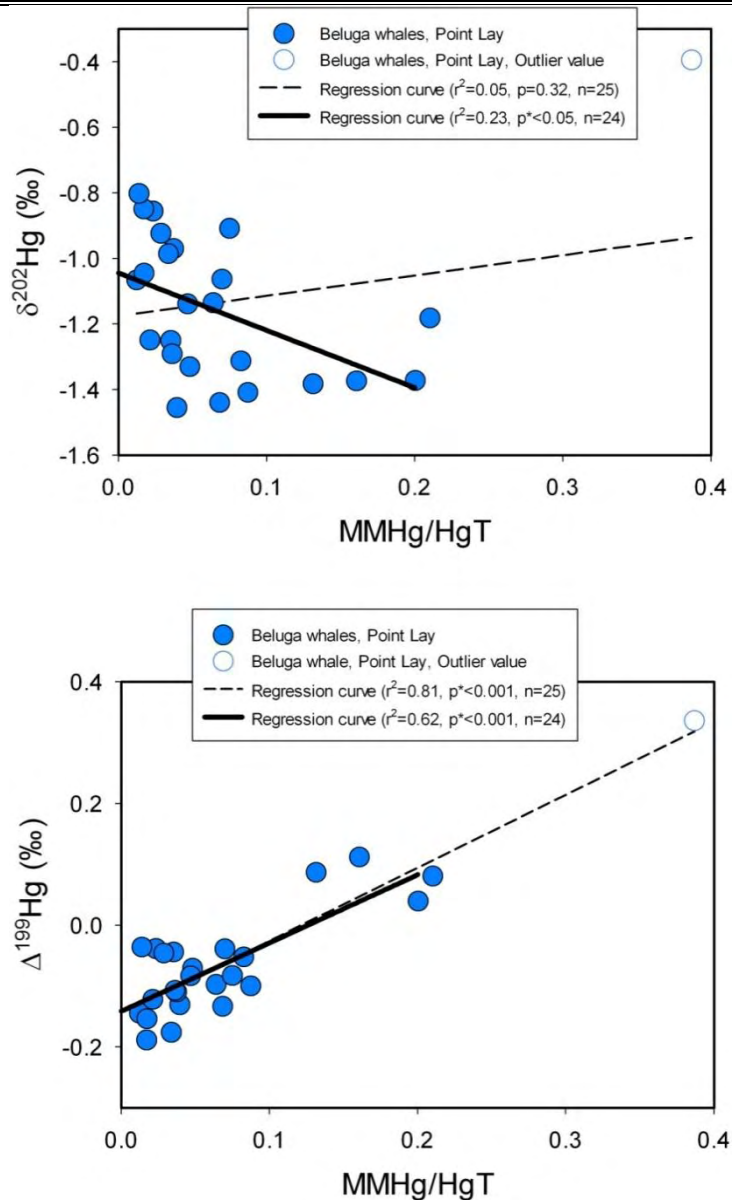


Figure S5: $\delta^{202}\text{Hg}$ vs MMHg/HgT (top) and $\Delta^{199}\text{Hg}$ vs MMHg/HgT (bottom) for beluga whales from Point Lay ($n=25$). Various regression curves have been determined with or without removing MM15L058C outlier values.

Bibliography

- Becker, P.R. et al., 1995. Relationship of silver with selenium and mercury in the liver of two species of toothed whales (odontocetes). *Marine Pollution Bulletin*, 30(4): 262-271.
- Dehn, L.-A. et al., 2006. Trophic relationships in an Arctic food web and implications for trace metal transfer. *Science of The Total Environment*, 362(1-3): 103-123.
- Point, D. et al., 2011. Methylmercury photodegradation influenced by sea-ice cover in Arctic marine ecosystems. *Nature Geosci*, 4(3): 188-194.

Chapitre 6.

L'étude de la composition isotopique des différentes formes chimiques du mercure dans les tissus de mammifères aquatiques permet d'établir le lien entre l'exposition au méthylmercure et la réponse métabolique

Chapitre 6. L'étude de la composition isotopique des différentes formes chimiques du mercure dans les tissus de mammifères aquatiques permet d'établir le lien entre l'exposition au méthylmercure et la réponse métabolique

Résumé

Le monométhylmercure (MMHg) est une puissante neurotoxine qui est produite naturellement dans les écosystèmes aquatiques. Ses propriétés bioaccumulables mènent à des concentrations significatives en bout de chaîne alimentaire. La principale voie d'exposition chez l'Homme et chez les mammifères marins se fait via la consommation de poisson. Cependant, le lien entre l'exposition au MMHg et sa concentration ou proportions dans les différents organes et tissus reste largement méconnu. En effet, un cycle complexe se produit *in-vivo* faisant intervenir simultanément des cinétiques de réactions/demi vies, des taux de distributions entre les tissus et des processus de détoxification métaboliques.

A l'interface d'une étude analytique et d'une étude environnementale, nous apportons dans ce chapitre des réponses à ces questions par l'analyse de la composition isotopique des différentes formes de Hg (MMHg et Hg inorganique) présentes dans différents tissus de mammifères marins de l'Arctique (baleine beluga, *Delphinapterus leucas*) et du Lac Baikal (phoques d'eau douce, *Phoca sibirica*). Suite au développement analytique initié par Epov et al. (2008), cette étude présente les premières données environnementales de Hg-CSIA déterminé sur des tissus biologiques par GC-MC-ICPMS.

Les résultats dans le foie des individus montrent un enrichissement systématique en isotopes légers $\delta^{202}\text{Hg}$ chez le Hg inorganique par rapport au MMHg. Ce résultat suggère que la dégradation hépatique du MMHg en Hg inorganique est un processus ne générant qu'un fractionnement dépendant de la masse (MDF). L'analyse de tissus complémentaires (pancréas, rein, intestin, diaphragme, muscle et poils) montre aussi que les variations des signatures $\delta^{202}\text{Hg}$ sont principalement contrôlées par les différences d'affinités des tissus/organes vis-à-vis du MMHg comparé au Hg inorganique. Cela suggère que le MMHg déméthylé dans le foie est mélangé dans le sang avec du MMHg fraîchement ingéré et il est incorporé dans les tissus/organes de façon continue.

Chapitre 6. L'étude de la composition isotopique des différentes formes chimiques du mercure dans les tissus de mammifères aquatiques permet d'établir le lien entre l'exposition au méthylmercure et la réponse métabolique

Au contraire, nous n'avons pas détecté de différences significatives dans les signatures isotopiques indépendantes de la masse (MIF, $\Delta^{199}\text{Hg}$) selon la forme du Hg et l'organe pour un même individu. Ce résultat suggère l'absence de MIF biologique ou métabolique, mais aussi que la plupart des tissus/organes sont capables de tracer de façon précise la source de MMHg via l'utilisation de leur signature en $\Delta^{199}\text{Hg}$. Pour conclure, la mesure du Hg-CSIA se révèle être un outil précieux pour comprendre les processus qui lient l'exposition au MMHg à sa distribution métabolique et à son accumulation dans les tissus humains.

Cette étude est actuellement en préparation pour publication. Elle a été rédigée conjointement par Vincent Perrot (60%) et Jérémy Masbou (40%). L'analyse des échantillons en Hg-CSIA (bélugas et phoques) par GC-MC-ICPMS a été réalisée au LCABIE (Pau, France) par Vincent Perrot. L'analyse des échantillons en CV-MC-ICPMS (HgT) a été réalisée par Jérémy Masbou au laboratoire OMP (Toulouse, France).

Natural Hg isotopic composition of different mercury compounds in mammalian tissues links environmental methylmercury exposure to metabolic response

*Vincent Perrot^a, Jeremy Masbou^b, Mikhail V. Pastukhov^c, Vladimir N. Epov^a, David Point^b,
Sylvain Bérail^a, Paul R. Becker^d, Jeroen E. Sonke^b, and David Amouroux^a*

^aLaboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement, Institut des Sciences Analytiques et de Physico-chimie pour l'Environnement et les Matériaux, IPREM UMR-5254, CNRS-UPPA, Hélioparc, 2 Avenue du Président Pierre Angot, Pau, 64053, France

^bLaboratoire Géosciences Environnement Toulouse, Observatoire Midi-Pyrénées CNRS-IRD-Université de Toulouse 3, 14 avenue Edouard Belin, Toulouse, 31400, France

^cLaboratory of geochemical mapping and monitoring, Institute of Geochemistry SB RAS, 1A Favorskogo Street, PB-304, Irkutsk, 664033, Russia

^dNational Institute of Standards and Technology, Hollings Marine Laboratory, Charleston, South Carolina, USA

RECEIVED DATE

*Author for correspondence: perrot@magnet.fsu.edu

Abstract

Monomethylmercury (MMHg) is a potent neurotoxin naturally produced in aquatic ecosystems. The bioaccumulative properties of this toxin lead to significant concentrations at the top of the food chain. Fish consumption represents the main source exposure to MMHg for humans and aquatic mammals. However, linking MMHg exposure to its counterpart levels in tissues and organs remains largely miss understood because of the combination of unknown specific MMHg internal turnover kinetics, distribution rates among tissues and metabolic detoxification pathways. We investigated these questions by analysing the stable isotopic composition of Hg for its different compounds (MMHg and inorganic Hg(II)) in various tissues of aquatic mammal species from the Arctic marine environment (Beluga whales, *Delphinapterus leucas*) and from Lake Baikal (freshwater seals, *Phoca sibirica*). No difference for Hg independent isotope fractionation (MIF, $\Delta^{199}\text{Hg}$) was detected among Hg compounds and organs for the same mammal species. This absence of biological or metabolic origin for Hg MIF evidences that tissues/organ may trace accurately the source exposure for ambient MMHg using $\Delta^{199}\text{Hg}$ signature as a baseline value for the surrounding trophic ecosystem. On the other hand, liver samples showed a systematic enrichment of Hg(II) in lighter isotopes ($\delta^{202}\text{Hg}$) relative to MMHg, suggesting that the hepatic degradation of MMHg into Hg(II) is a unique mass dependent fractionation process (MDF). Analysis of complementary tissues (muscle, kidney) also revealed that Hg MDF variations are principally driven by the tissues/organ affinity for MMHg relative to Hg(II). This suggests that residual MMHg from demethylation is continuously mixed in the bloodstream with freshly ingested MMHg and redistributed among organs/tissues. Mercury compounds specific isotopic analysis may thus represent a valuable tool to provide a new insight on the processes that link MMHg exposure to its metabolic distribution and accumulation in human tissues.

Introduction

Mercury (Hg) is a potent cardio- and neuro-toxin (Fernandes Azevedo et al., 2012) present under various chemical forms in the environment and biota (Clarkson and Magos, 2006; Morel et al., 1998). The organic forms of Hg (especially monomethylmercury (MMHg)) display unique properties to cross cells membranes and bind to proteins, facilitating their accumulation and biomagnification in food webs (Clarkson et al., 2007; Fitzgerald et al., 2007; Morel et al., 1998) especially in the muscle compartment where it can represent up to 95% of the total bodily Hg burden (Harris et al., 2003; Morel et al., 1998). In aquatic systems, MMHg is mainly produced from inorganic mercury (Hg(II)) at the sediment interface or within the water column by natural biotic (Compeau and Bartha, 1985; Jensen and Jernelov, 1969) and/or abiotic processes (Celo et al., 2006; Wood et al., 1968). An opposite reaction to methylation, MMHg demethylation, is also a key process that is responsible for MMHg degradation in the aquatic environment and can also be mediated by natural biotic/abiotic processes (Black et al., 2012; Oremland et al., 1991). Demethylation is also suggested to result from internal metabolic activity in certain key organs (Clarkson and Magos, 2006; Eagles-Smith et al., 2009; Koeman et al., 1973; Wagemann et al., 1998). Located at the top of the food chain, aquatic mammals are known to accumulate significant amounts of Hg in their tissues (Ikemoto et al., 2004; Wagemann et al., 1998; Woshner et al., 2002), and are thought to share similarities in terms of Hg exposure, accumulation and detoxification pathways (Khan and Wang, 2010; Koeman et al., 1973; Pedrero Zayas et al., 2014). Record Hg levels have been measured in Arctic marine mammals posing a health risk for northern people who consume these as subsistence resources (Weihe et al., 2002). Mammal tissues are also used for biomonitoring purposes in order to understand spatiotemporal variations of Hg dynamics and exposure (Lockhart et al., 2005).

Understanding the accumulation, distribution among tissues and detoxification/elimination of Hg in aquatic mammals and by extent humans involves investigating complex and coupled metabolic transfer and transformations processes that remain largely overlooked (Bridges and Zalups, 2010; Pedrero et al., 2011). While ingestion of Hg is predominantly in the form of MMHg, internal tissues do not accumulate MMHg and Hg(II) to the same extent. This leads to a wide variation of Hg speciation among different organs and tissues (Bridges and Zalups, 2010; Ikemoto et al., 2004; Korbas et al., 2010; Seixas et al., 2008; Sonne et al., 2009; Watanabe et al., 1998). For example, specific Hg protein complexes (Hg-selenium and Hg-thiol containing biomolecules) have been found to influence the kinetics of accumulation and elimination of Hg compounds (i.e. MMHg and Hg(II)) in various tissues (Bridges and Zalups, 2010; Koeman et al., 1973; Korbas et al., 2010; Pedrero et al., 2011; Pedrero Zayas et al., 2014; Seixas et al., 2008; Sonne et al., 2009; Wagemann et al., 1998; Wagemann et al., 2000; Woshner et al., 2008). High concentrations and large fractions of Hg(II) relative to

Chapitre 6. L'étude de la composition isotopique des différentes formes chimiques du mercure dans les tissus de mammifères aquatiques permet d'établir le lien entre l'exposition au méthylmercure et la réponse métabolique

MMHg have been observed in liver and kidney of aquatic mammals (Seixas et al., 2008; Wagemann et al., 2000; Woshner et al., 2008) suggesting that these two key organs play an active role in MMHg detoxification, and subsequent accumulation into non toxic inert Hg(II)-selenium complexes (Branco et al., 2007; Eagles-Smith et al., 2009; Pedrero et al., 2011; Pedrero Zayas et al., 2014; Wagemann et al., 2000). Other studies have also suggested that the central nervous system may also be an important site for the demethylation of MMHg (Clarkson and Magos, 2006; Korbas et al., 2010).

Measurement of Hg stable isotopic composition in biological and environmental matrices is now a recognized tool to explore Hg cycling in natural environments (Bergquist and Blum, 2009). In aquatic ecosystems biota display a large range of Hg isotope signatures in their tissues (Sonke, 2011; Yin et al., 2010). Hg has seven stable isotopes which can undergo mass-dependent and mass-independent isotope fractionation (MDF and MIF, respectively) during specific transformations such as methylation and demethylation (Bergquist and Blum, 2007; Jimenez-Moreno et al., 2013; Kritee et al., 2009; Rodriguez-Gonzalez et al., 2009), reduction (Bergquist and Blum, 2007; Kritee et al., 2008; Zheng and Hintelmann, 2010) and volatilization (Estrade et al., 2009; Zheng et al., 2007). Previous experimental and in-situ studies suggest that photochemistry plays a dominant role in generating Hg MIF in the natural environment (Bergquist and Blum, 2007; Bergquist and Blum, 2009; Perrot et al., 2012; Sonke, 2011). Especially, dissolved organic matter mediated Hg(II) photoreduction and MMHg photodemethylation in the water compartment produce significant positive MIF in the Hg species remaining in solution (Bergquist and Blum, 2007; Zheng and Hintelmann, 2009; Zheng and Hintelmann, 2010). However, it is still under debate if Hg trophic transfer and/or in vivo transformations lead to MDF and/or MIF of Hg isotopes (Bergquist and Blum, 2007; Das et al., 2009; Kwon et al., 2012; Perrot et al., 2012; Senn et al., 2010). When MMHg and Hg(II) undergo biochemical transformations in body tissues and organs, one would expect their respective isotopic composition to change, thus identifying Hg compounds specific isotopic signatures in different tissues and key organs could provide insights of the biological mechanisms that control Hg bioaccumulation, transfer and transformation in evolved organisms such as mammals.

We measured total Hg (HgT), MMHg and Hg(II) concentrations and isotopic composition in tissues (liver, kidney, muscle, intestine, pancreas, diaphragm and hair) of freshwater seals (*Phoca sibirica*) from Lake Baikal (Russia), and in livers of beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the Alaskan Arctic marine environment. Previous studies showed that both species were characterized by relatively high Hg levels in their tissues (Becker et al., 2000; Ciesielski et al., 2010). Here, we investigated for the first time the specific stable isotope signatures of different Hg compounds in various tissues of these two mammalian species to provide new insight into the processes that link MMHg exposure to its metabolic distribution, transfer and accumulation in aquatic mammal and by extent humans in first approximation.

Materials and methods

Sample collection and description

Beluga whale (*Delphinapterus leucas*) liver samples were obtained from the US National Environmental Specimen Bank (Charleston, SC, USA). The fresh cryogenically archived liver samples are from specimens collected in the Eastern Chukchi Sea from the Alaskan Arctic region (1990-1999). Freshwater seal tissue samples (*Phoca sibirica*) originate from the deep, large and oligotrophic Lake Baikal (Russia) (Perrot et al., 2010; Perrot et al., 2012), which include liver, pancreas, kidney, thick intestine, hair, muscle (Perrot et al., 2012), and diaphragm). Both mammal species are located at the top of the food web of their respective marine and lacustrine ecosystems (Figure S5). More details are available elsewhere (Ciesielski et al., 2010; Point et al., 2011), and in the SI section (SI Methods, Description of the Samples, Sampling and Storing Procedures).

Analytical techniques

All reagents and standards used for this study were ultra-pure quality. Uncertainties on the measurements are reported throughout the manuscript either as 2SD when it is related to a single sample (triplicates of analysis) or as SD when it is an average on different samples.

Hg compounds concentration measurements (GC-ICPMS)

About 200 mg of sample tissue was digested in 5 mL of 25% Tetramethyl ammonium hydroxide (Fisher Scientific) under soft microwave-assisted extraction (CEM discover, 75°C, 4 min). MMHg and Hg(II) species were determined by ID-GC-ICPMS after aqueous phase derivatization, using detailed protocols available elsewhere (Monperrus et al., 2008; Rodriguez Martin-Doimeadios et al., 2004). The sum of the Hg species was compared to total Hg (Hgtot) analysis performed by DMA 80 (Milestone) to verify the recovery of the extraction. Certified reference materials for MMHg and Hgtot concentrations (IRMM BCR-CRM 464 tuna fish muscle and DOLT-4 NRC-CNRC dogfish liver), together with an in-house matrix matched whale liver control material (NIST QC03LH03), were used for ensuring method validation and measurement traceability. Possible Hg species interconversions during the analytical sample preparation procedures were also evaluated by enriched isotope pattern deconvolution (Rodriguez-Gonzalez et al., 2005).

Total Hg isotopic composition measurements by CVG-MC-ICPMS

The isotopic composition of total Hg was measured using multicollector inductively coupled plasma mass spectrometry (MC-ICPMS) coupled with continuous flow cold vapor generation (CVG), either with a MC-ICPMS Neptune (ThermoFisher, Bremen, Germany) at GET (Toulouse, France) or a

MC-ICPMS HR Nu Plasma (Nu Instruments, Wrexham, UK) at IPREM-LCABIE (Pau, France). Details of sample preparation and analytical techniques in both cases are described in the SI section (SI Methods, Sample Preparation and Analytical Techniques for Stable Isotope Ratios Measurements). Approximately 200 mg of sample tissues was digested with acid (UltrexII J.T. Baker, or in-house bi-distilled) and microwave extraction (CEM) or Digi-prep. Final concentrations of the samples analyzed by multicollector were between 0.5-5 ng.g⁻¹ depending on the analytical batch, matching within 15% the concentration of the NIST 3133 bracketing standard. Isotopic compositions are reported as $\delta^{\text{xxx}}\text{Hg}$ values using the equations proposed elsewhere (Bergquist and Blum, 2007) and reported in the SI (SI Methods, equations (4) to (8)). External standards (whale liver QC03LH03, CRM464, DOLT-4 and UM-Almadén) were measured with each sample batch and compared to previously published results when available (Bergquist and Blum, 2007; Epov et al., 2008; Perrot et al., 2010) and were used to report the typical uncertainties on the long-term reproducibility (2SD) of the sessions of measurements (Table S3).

Hg compounds-specific stable isotope composition (CSIA) analysis by GC-MC-ICPMS

Hg-CSIA analysis was made on transient signals by GC-MC-ICPMS following a derivatization step in organic solvent using methods published elsewhere (Epov et al., 2010; Epov et al., 2008; Rodriguez-Gonzalez et al., 2009) and summarized in the SI section (SI Methods, Sample Preparation and Analytical Techniques for Stable Isotope Ratios Measurements). The main issues of the hyphenation is the short time available for isotope ratios measurements, the small quantities of Hg species introduced, and the pronounced isotope ratio drift during the analyte transient passage. A recently proposed method of calculation (Epov et al., 2010) addresses these issues and improves the accuracy and precision of the measurement. Since mammals tissues are lipid and protein rich biological complex matrices, a careful approach was used to assess the experimental results and to prevent possible analytical artefacts. Hg-CSIA measured by GC-MC-ICPMS were consequently also validated against total Hg stable isotope measurements obtained by CVG-MC-ICPMS by mass-balance, summing the isotopic composition of the individual Hg species and considering the relative species concentrations. Agreements between the two methods are summarized in Figure S1.

Results

Hg compounds specific stable isotope composition (Hg CSIA) was measured by GC-MC-ICPMS (Epov et al., 2010). Our results show that GC-MC-ICP-MS represents a suitable tool to measure Hg CSIA in biological matrices since the Hg isotopes mass-balance calculated from Hg CSIA and Hg compounds concentration fractions was in excellent agreement with total Hg isotopic composition determined by CV-MC-ICPMS (ANOVA t-test, $r^2=0.96$, $p^*< 0.0001$, $n=23$) (Figure S1).

Hg compounds fractions were calculated from Hg speciation measurements performed by Isotope Dilution GC-ICPMS (ESI).

Total Hg, Hg(II) and MMHg concentrations in mammal tissues

Total Hg concentrations in mammal tissues varied significantly between samples, depending on the mammal species (i.e. beluga or seal), their age and/or the type of organ and tissue analyzed (Tables S1 and S2). For liver samples, HgT concentrations ranged from 1.5 to 100.5 and from 0.3 to 18.1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ for beluga whales (w.w) and seals (d.w.) respectively. We previously reported that seal muscle HgT concentrations ranged from 0.1 to 1.1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ whereas young seals (less than 2-months old) showed significantly lower ($p^* < 0.0003$) Hg contents ($0.28 \pm 0.03 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $n=4$) than seals older than one year ($0.92 \pm 0.16 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $n=3$) (Perrot et al., 2012). Hg in other organs of the oldest seal (9-years old) ranged from 0.5 to 8.4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, and following the decreasing order: kidney>hair>diaphragm>pancreas>thick intestine. By far and in this order, liver, kidney, and hair were the tissues showing the highest Hg accumulation in seals, which is consistent with other results (Ikemoto et al., 2004).

Hg speciation among the different tissues was, like HgT contents, influenced by the type of tissue considered (Figure S2). Previous studies on aquatic mammals showed that liver and kidney tissues were predominantly enriched with Hg(II), relative to muscle and hair samples that tend to mainly accumulate MMHg (Seixas et al., 2008; Wagemann et al., 1998). In this study, liver and kidney samples exhibited the highest fractions of inorganic Hg (fHg(II)) ranging from 0.55 to 0.99, with Arctic beluga whale livers showing higher ($p^* < 0.02$) Hg(II) fractions (0.89 ± 0.11 , $n=11$) than Lake Baikal seal livers (0.72 ± 0.16 , $n=7$). Two kidney samples from 9 and 2 year old seals respectively showed Hg(II) fractions of 0.92 ± 0.02 and 0.76 ± 0.03 , respectively. Conversely, seal muscle and hair samples were characterized by lower Hg(II) fractions, and accumulated mainly MMHg (fHg(II)) ranging from 0.13 to 0.20). Other seal tissues such as diaphragm, pancreas and thick intestine displayed intermediate Hg(II) fraction levels ranging between 0.28, to 0.47. Overall, a significant positive relationship was observed between fHg(II) and $\ln \text{HgT}$ ($n = 31$, $r^2=0.71$, $p^* < 0.0002$, Figure S3) for the different seal samples.

Hg stable isotopic compositions in mammal tissues

Total Hg stable isotope signatures

Overall, total Hg isotopic compositions measured in the different mammal organs displayed strong MDF variations among samples ($\delta^{202}\text{Hg}$ ranging from -1.41 to 2.39‰, Figure 1 and Tables S1 and S2). Beluga liver samples all exhibited negative $\delta^{202}\text{Hg}$ values ($-1.04 \pm 0.29\text{‰}$, $n=11$), similar to the

Chapitre 6. L'étude de la composition isotopique des différentes formes chimiques du mercure dans les tissus de mammifères aquatiques permet d'établir le lien entre l'exposition au méthylmercure et la réponse métabolique

livers and kidneys signature determined for the oldest seals of the dataset (i.e. older than one year) with $\delta^{202}\text{Hg}$ values of $-0.53 \pm 0.10\text{‰}$ ($n=5$). On the other hand, seal tissues showing the highest fraction of MMHg (i.e. muscles, diaphragm and hair, $f\text{Hg(II)} < 0.3$) were characterized by highly positive $\delta^{202}\text{Hg}$ signatures ($1.89 \pm 0.34\text{‰}$, $n=9$). Other seal tissues (thick intestine, pancreas, and livers of young seals) characterized by intermediate Hg speciation levels ($f\text{Hg(II)}$ between 0.45 and 0.75) showed intermediate $\delta^{202}\text{Hg}$ values ($1.05 \pm 0.22\text{‰}$, $n=6$). Thus, a clear negative correlation was observed between $\delta^{202}\text{Hg}$ and Hg(II) fractions among all seal samples (Figure 1), suggesting end member signatures of $\delta^{202}\text{Hg}$ of $2.57 \pm 0.13 \text{‰}$ for MMHg and $\delta^{202}\text{Hg}$ of $-1.00 \pm 0.13\text{‰}$ for Hg(II). This result can only be explained by a tissues/organ selective accumulation for Hg compounds (i.e. MMHg and Hg(II)) having different initial isotopic composition (Laffont et al., 2011), or by internal process(es), such as demethylation, changing the Hg isotopic composition of individual Hg compounds before their accumulation among the different tissues.

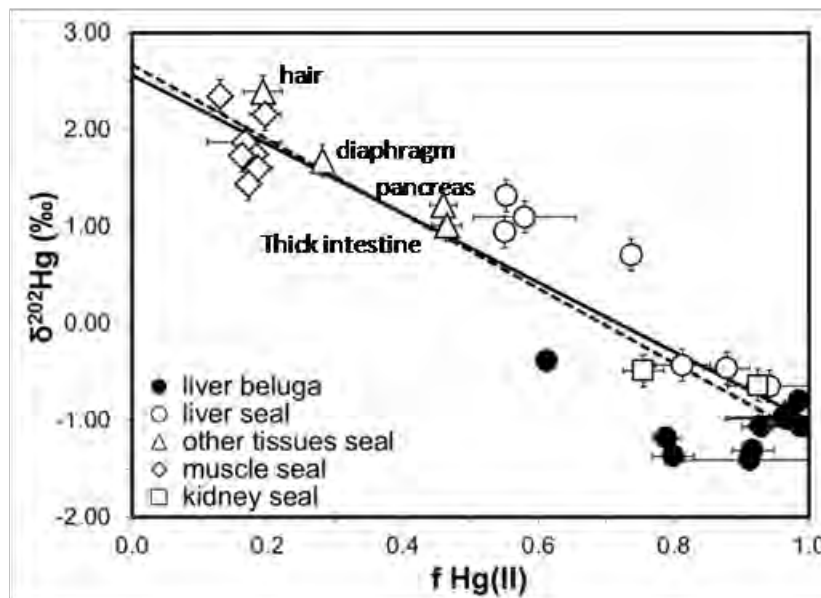


Figure 1: Total stable Hg isotopic composition (expressed as $\delta^{202}\text{Hg}$) and fraction of Hg(II) in several tissues of belugas whales (filled symbols) and seals (open symbols). Hair, diaphragm, pancreas and thick intestine (triangles) of a unique Seal (s19) are annotated on the figure. Dashed line is the correlation line for all data points ($y = -3.85x + 2.67$, $R^2 = 0.88$, $p < 0.01$, $n = 30$). Solid line is the correlation line considering only seal samples ($y = -3.57x + 2.57$, $r^2 = 0.90$, $p^ < 0.01$, $n = 19$). Error bars are given as SD of analysis triplicates for Hg(II) fraction, and as the external reproducibility (2SD) of UM-Almadén Hg isotopic ratios measurements for $\delta^{202}\text{Hg}$ (SI Results, Precision and Accuracy on Hg Stable Isotope Ratios Measurements).*

MIF signatures of odd Hg isotopes (199 and 201) evidenced striking differences between mammal tissues from the Arctic marine and the freshwater lake environments (Table S2 and Figure

S4). Beluga livers displayed a negligible MIF magnitude ($\Delta^{199}\text{Hg}=-0.02\pm 0.14\%$, $n=11$) compared to seal organs from lake Baikal, characterized by significantly higher MIF values ($\Delta^{199}\text{Hg}=4.37\pm 0.69\%$, $n=20$). This difference likely reflects the difference of Hg photochemistry between the two ecosystems considered. The Arctic marine ecosystem is largely covered by sea ice and characterized by dark conditions several months per year. These conditions have shown to inhibit Hg photochemistry, and by extent Hg MIF, in particular for food web located above the Arctic Circle (Point et al., 2011). On the contrary, Lake Baikal is characterized by intense Hg photochemistry emphasised by the significantly higher Hg MIF values measured in its pelagic foodwebs (Perrot et al., 2012). The $\Delta^{199}\text{Hg}:\Delta^{201}\text{Hg}$ regression slope (1.23 ± 0.03 , $n = 20$, $r^2=0.99$, $p^*< 0.0001$, Figure S4) observed among Baikal seal tissues is in agreement with the bioaccumulation of an aquatic MMHg pool that has been altered by photodemethylation (Bergquist and Blum, 2007). However and contrary to MDF, no relationship was observed between Hg compounds fractions and Hg MIF for the different organ and tissues analysed. This argues for *in-vivo* Hg isotope fractionation process that only involves MDF between MMHg and Hg(II) rather than selective accumulation of two Hg pools (MMHg and Hg(II)) having their specific Hg isotopic composition before assimilation in the body. To definitely answer this question, MMHg and Hg(II) compounds-specific Hg isotopic composition was further studied

Hg Species-specific stable isotope composition

Among all samples, significant differences existed between the isotope signatures of Hg(II) and MMHg (Figure 2). Both beluga livers and seal tissues showed MMHg signatures enriched in the heavier isotopes ($\delta^{202}\text{Hg} = 0.84\pm 1.05\%$, $n=10$ and $2.47\pm 0.47\%$, $n = 10$, respectively) relative to Hg(II) fractions ($\delta^{202}\text{Hg} = -1.26\pm 0.48\%$, $n=11$ and $-0.73\pm 0.32\%$, $n=10$), respectively. We note that B-455 liver sample MMHg isotopic composition is not reported due to the very low MMHg content for this sample ($f\text{MMHg}=0.01$), not compatible with GC-MC-ICPMS measurements (SI Results, Precision and Accuracy of Hg Stable Isotope Ratios Measurements). No significant odd isotopes anomalies and differences for Hg compounds could be detected in beluga liver samples ($\Delta^{199}\text{Hg}=-0.02\pm 0.46\%$, $n=10$, and $-0.03\pm 0.27\%$, $n=10$, for MMHg and Hg(II) respectively).

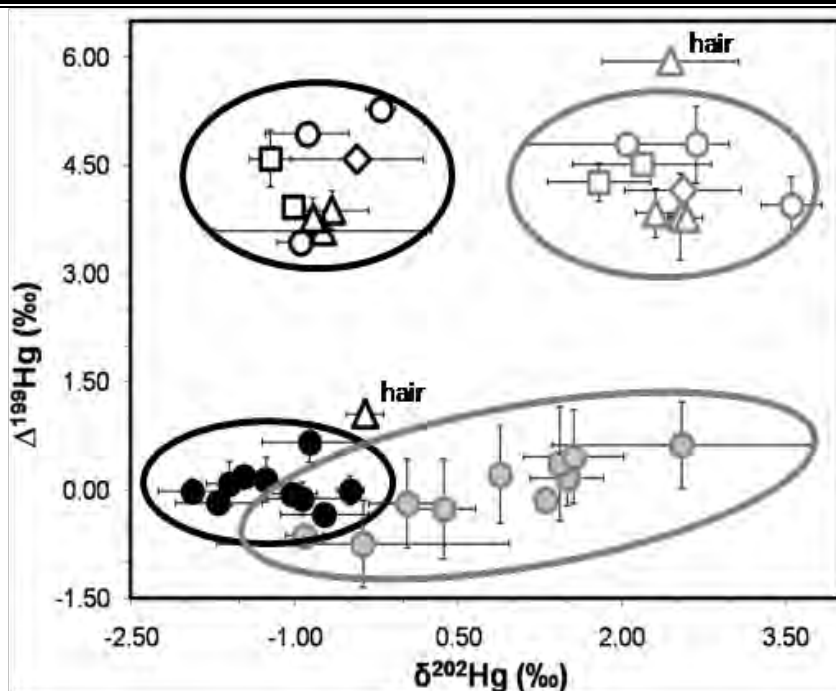


Figure 2: Hg-CSIA MDF and MIF signatures (expressed as $\delta^{202}\text{Hg}$ and $\Delta^{199}\text{Hg}$, respectively) in several tissues of belugas whales (liver; filled symbols) and seals (open symbols; liver (circles), kidney (squares), muscle (diamond) and other tissues (triangles)). Hg(II) and MMHg are shown in black and grey symbols, respectively. Among several bodily tissues of a single seal specimen (P-17) represented as triangles on the figure (hair, diaphragm, pancreas and thick intestine), the hair is aberrant and highlighted as such. Error bars represent the 2SD of triplicate measurements by GC-MC-ICPMS.

For seal tissues, although no statistical difference could be evidenced between Hg(II) and MMHg ($\Delta^{199}\text{Hg}=4.38\pm 0.67\%$, $n=10$, and $3.90\pm 1.17\%$, $n=10$, for MMHg and Hg(II) respectively) given the respective precision of GC-MC-ICP-MS measurements. The high standard deviations observed are due to the unique seal hair sample of the dataset (P-17Ha) which is the only tissue to show significantly higher $\Delta^{199}\text{Hg}$ for MMHg ($4.97\pm 0.07\%$) relative to $\Delta^{199}\text{Hg}$ of Hg(II) ($0.85\pm 0.30\%$). This sample is not discussed later in this manuscript because it may be a site for additional (i.e. external) Hg transformations and supply at hair surface, thus not necessarily due to internal in vivo processes after Hg exposure via food consumption (SI Discussion, Hair Hg-CSIC). Excluding this atypical sample, lead to more homogeneous $\Delta^{199}\text{Hg}$ results between MMHg and Hg(II) ($4.20\pm 0.41\%$, $n = 9$ and $4.22\pm 0.65\%$, $n = 9$, respectively). As observed total Hg isotopic composition in seal tissues, Hg(II) and MMHg CSIC MIF signatures lie on the MMHg photodemethylation slope rather than the Hg(II) photoreduction slope (Bergquist and Blum, 2007) (Figure 3).

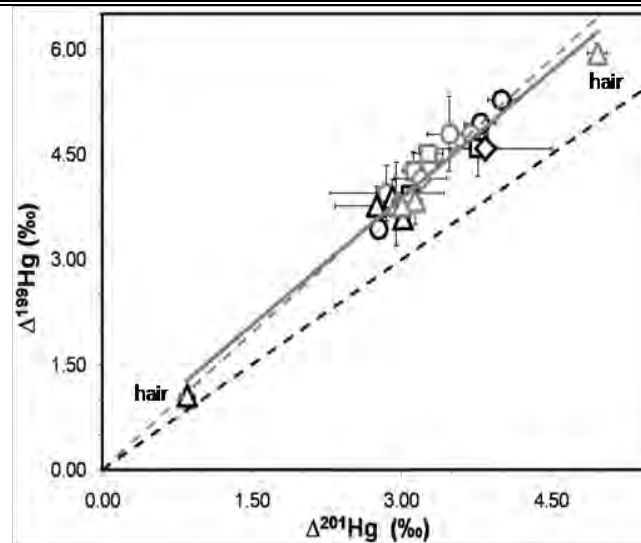


Figure 3: $\Delta^{199}\text{Hg}$ versus $\Delta^{201}\text{Hg}$ for Hg-CSIA in seal tissues. The grey dashed line represents the ratio $\Delta^{199}\text{Hg}:\Delta^{201}\text{Hg}$ expected from photodemethylation of MMHg and the black dashed line represents the ratio $\Delta^{199}\text{Hg}:\Delta^{201}\text{Hg}$ expected from photoreduction of inorganic Hg(II) (Bergquist and Blum, 2007). Both MMHg (grey open symbols) and Hg(II) (black open symbols) are located on the “MMHg photodemethylation slope” (linear regression ($n=20$, slope=1.21, $r^2=0.95$, $p<0.01$), grey solid line) indicating a common Hg origin (MMHg from food) for both MMHg and Hg(II) in seal tissues. The single seal hair is not included in the regression. Error bars represent the 2SD of triplicate measurements by GC-MC-ICPMS.

Discussion

Hg MDF as a proxy for metabolic MMHg turnover and distribution

We observed a large variability in Hg speciation, mainly explained by specific tissues affinity (Figure 1 and Figure S2), associated with the homogeneous compounds-specific $\delta^{202}\text{Hg}$ values independent of species fractions (and thus independent of the type of internal tissue, Figure 2). This suggests that, for tissues containing a significant fraction of Hg(II), measuring total Hg stable isotope MDF signatures in the tissues of mammals is not a sufficient tool to trace Hg cycle in their ecosystem. In a recent study (Perrot et al., 2012) we showed that seal muscles were enriched by 1‰ in $\delta^{202}\text{Hg}$ relative to the fish that compose their diet (Yoshii et al., 1999). We thus suggested that in vivo processes during trophic transfer was at the origin of Hg MDF and lead to accumulation of MMHg in seal muscles that is enriched in heavier isotopes relative to their prey. Previous work also showed that the human hairs with a fish-dominated diet had about 2‰ higher $\delta^{202}\text{Hg}$ values than the fish consumed (Laffont et al., 2009). However, a recent laboratory study reported Hg stable isotopes in fish and their associated food (pellets) (Kwon et al., 2012) and suggested the absence of MDF during trophic

transfer. Both conclusions may coexist assuming that fish and mammals have different metabolisms and that MMHg incorporation, transport and redistribution among organs and tissues is probably different under natural diet and experimental feeding studies on small fish species. MMHg metabolic transformation and transfer rates may vary significantly within the same species, but also among species depending on parameters such as body size, water temperature, depth, food availability and foraging strategy (Gillooly et al., 2001; Seibel and Drazen, 2007). Thus, biochemical reactions and associated rates that involve Hg compounds in tissues may differ greatly between fish and mammals, and this may at some point also influence Hg trophic transfer (Boudou and Ribeyre, 1997). For example, fish probably do not display the same ability to detoxify and excrete eliminate Hg compounds compared to bigger and more evolved mammals (Booth and Zeller, 2005; Bridges and Zalups, 2010). Hence, if these in vivo processes fractionate mercury isotopes, it is likely that the subsequent accumulation and storage of the different Hg compounds having different isotopic signatures may lead to different total Hg isotope compositions in mammal tissues (Sherman et al., 2013).

Biological transformations of Hg compounds by microorganisms produce Hg MDF (Kritee et al., 2013). During experimental demethylation of MMHg by *Escherichia coli*, involving enzymatic reaction, the remaining MMHg pool was observed to become progressively enriched in heavier isotopes following a kinetic isotope fractionation law (Kritee et al., 2009). Hepatic MMHg demethylation in mammals has been postulated to occur via enzyme activity (NADPH-cytochrome P-450 reductase) in phagocytic cells (Suda and Hirayama, 1992; Suda et al., 1993). Following MMHg demethylation, the product (Hg(II)) and the residual MMHg can be subsequently distributed to the different organ and tissues by the bloodstream where they are likely complexed by specific ligands (e.g. S-conjugates of thiol containing amino-acids, peptides and/or GSH, metallothionein) (Bridges and Zalups, 2010; Clarkson et al., 2007; Pedrero et al., 2011; Pedrero Zayas et al., 2014). As kinetic Hg MDF was previously observed during dark microbial transformations of Hg(II) and MMHg (Kritee et al., 2009; Kritee et al., 2008; Kritee et al., 2013), we suggest here that the biologically mediated hepatic demethylation step is likely the main process inducing Hg MDF. In vivo demethylation is also probably the rate-limiting step assuming constant MMHg supply from food. However, Hg diffusion across cell membranes and binding to specific ligand cannot be totally ruled out (Kritee et al., 2013). We thus hypothesize that (1) demethylation kinetics of MMHg in mammal liver lead to Hg MDF that enrich the residual MMHg pool in the heavier isotopes relative to the produced Hg(II) fraction, and (2) the different Hg species subsequently accumulated in target tissues preserve the isotopic signature of the former demethylation step before being continuously mixed with freshly ingested MMHg in the bloodstream. These hypotheses are strongly supported by our results exhibiting specific $\delta^{202}\text{Hg}$ for each Hg compounds (independent of the type of tissue, Figure 2), and the linear increase of total Hg

$\delta^{202}\text{Hg}$ as a function of increasing MMHg fraction for the different organ and tissues investigated (Figure 1). In addition, Hg CSIC results are in excellent agreement, within the associated uncertainties, with the calculated MMHg and Hg(II) end-members obtained from the linear regression of Figure 1. This further allows calculating an isotope enrichment factor associated to *in vivo* demethylation and to estimate the percentage of MMHg in seal muscles that is residual from this hepatic demethylation step (SI Discussion, Estimation of *In Vivo* Demethylation Extent in Baikalian Seals). Assuming that seal muscle MMHg isotope signatures represent a mixed pool of fresh dietary MMHg and MMHg residual from demethylation, it can be assumed that about 40% of MMHg accumulated in seals muscle originates from *in vivo* demethylation. This provides a strong argument to explain the origin of the higher $\delta^{202}\text{Hg}$ signatures observed in seals muscles samples relative to dietary (fish) MMHg signatures (Perrot et al., 2012). As a consequence, it is likely that *in vivo* hepatic demethylation of MMHg occurring in mammals lead to a residual fractionated MMHg isotope signature observed in the tissues relative to Hg isotope signature observed in the diet. This process may account for the difference of Hg isotopic composition observed during trophic transfer (Laffont et al., 2009; Perrot et al., 2012).

MIF as metabolic-independent and ecosystem wide proxy for MMHg source exposure

Despite a few studies have hypothesized a possible *in vivo* Hg MIF origin (Das et al., 2009), our results are in agreement with most of the current literature, evidencing the absence of Hg MIF during biological transformations or Hg trophic transfer (Kritee et al., 2013; Laffont et al., 2009; Perrot et al., 2012; Rodriguez-Gonzalez et al., 2009). Indeed, Hg MIF signatures for total Hg isotopic compositions and CSIC of Hg(II) and MMHg were nearly identical for all seals tissue samples investigated (Figure 2, and Table S2). Furthermore, nearly identical $\Delta^{199}\text{Hg}:\Delta^{201}\text{Hg}$ slope ratios could be determined for the two Hg compounds with values of 1.32 ± 0.06 ($n = 9$) for MMHg and 1.27 ± 0.06 ($n = 9$) for Hg(II) respectively (1.27 ± 0.01 ($n = 19$) for HgT). As displayed in Figure 3 and Figure S4, this suggests that both Hg compounds may have the same origin, i.e. residual MMHg from photodemethylation in the water column further incorporated in the food web (Bergquist and Blum, 2007). Indeed, in the case of the selective bioaccumulation of compounds and according to MMHg and Hg(II) photoreduction experiments, the Hg(II) fraction incorporated in seals should have a $\Delta^{199}\text{Hg}:\Delta^{201}\text{Hg}$ value close to 1.0 rather than 1.3 (Bergquist and Blum, 2007). This indicates again that MMHg and Hg(II) accumulated in mammals originate from the same Hg source of dietary origin instead of considering the selective accumulation of Hg originating from different sources (i.e. MMHg from diet and Hg(II) from water/sediment). Finally, Hg MIF values determined in seals tissues were found similar to the MIF signatures observed in their main prey items (sculpin fish) (Perrot et al., 2012), evidencing again the absence of Hg MIF during trophic transfer. Similar results could be evidenced for beluga whale livers, showing homogenous and average insignificant Hg MIF values ($\sim 0\text{‰}$) among HgT and CSIC measurements of Hg(II) and MMHg. Under the light of these results,

the main conclusion suggest that most Hg MIF variations may be expected among eco-systems displaying contrasted Hg photochemistry conditions, rather than at the ecosystem or sub-ecosystem level where baseline Hg MIF signatures are preserved during the biomagnification process of local food chains.

This study showed that the compound specific analysis of individual Hg compounds represents a valuable new tool capable of providing new insight for tracing the origin of MMHg incorporated in food web, but at the same time unravelling the internal fractionation process occurring during the metabolic incorporation, transformation and diffusion of Hg in leaving organisms. We observed that total Hg isotopic composition in tissues of geographically unrelated mammals is mostly dependent on Hg speciation, and that Hg compounds (i.e. Hg(II) and MMHg) have unique specific isotope signatures. We suggest that hepatic demethylation of MMHg in mammals is the main process producing mass-dependent fractionation of Hg isotopes during trophic transfer. We also confirmed previous suggestions that Hg MIF is unlikely to occur *in-vivo*, which implies that photochemical processes are still the best candidates to explain Hg MIF observed in nature. Direct measurements of Hg isotopes ratios in marine and freshwater had not yet been feasible due to the very low concentrations, but our study confirms the ability of biota to be used as an indirect probe. As displayed in Figure 2, the multi-dimensional stable isotope discrimination between Hg compounds in mammal organs, and between photochemically contrasted aquatic ecosystems, demonstrates that Hg species-specific MDF and MIF signatures in tissues provide insight on internal and external processes that affects mammal exposure to toxic MMHg. This approach could further be used to understand the extra- in intra-cellular mechanisms involved in the Hg metabolism in humans.

Acknowledgements

This work is supported by research grants EC2CO Cytrix (Merlaba project) from the French CNRS/INSU, ANR-09-JCJC-0035-01 from the French Agence Nationale de Recherche and ERC-2010-StG_20091028 from the European Research Council. This work has also been supported by the Aquitaine Region for the MC-ICPMS and GC-ICPMS facilities at LCABIE-IPREM (Pau, France). We acknowledge the Institute of Geochemistry (SB RAS, Russia) and NBSB at the National Institute of Standards and Technology (NIST), which provided seal and beghula whale samples, respectively. VP and JM are grateful to the « Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche » for their Doctoral Fellowships (Ecole Doctorale ED211/UPPA and ED SDU2E/UPS, respectively). This manuscript acknowledges and pays tribute to our colleague V.N. Epov (CNRS, LCABIE-IPREM, Pau, France) who initiated the MerLaBa project and passed away in 2012.

Bibliography

- Becker, C. et al., 2000. Concentrations of Polychlorinated Biphenyls (PCB's), Chlorinated Pesticides, and Heavy Metals and Other Elements in Tissues of Belugas, *Delphinapterus leucas*, from Cook Inlet, Alaska. *Marine Fisheries Review*, 62(3): 81-98.
- Bergquist, B.A., Blum, J.D., 2007. Mass-dependant and -independent fractionation of Hg isotopes by photoreduction in aquatic systems. *Science*, 318: 417-420.
- Bergquist, B.A., Blum, J.D., 2009. The Odds and Evens of Mercury isotopes : Applications of Mass-Dependent and Mass-Independent Isotope Fractionation. *Elements*, 5: 353-357.
- Black, F.J., Poulin, B.A., Flegal, A.R., 2012. Factors controlling the abiotic demethylation of monomethylmercury in surface waters. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 84: 492-507.
- Booth, S., Zeller, D., 2005. Mercury, Food Webs, and Marine Mammals: Implications of Diet and Climate Change for Human Health. *Environmental Health Perspectives*, 113(5): 521-526.
- Boudou, A., Ribeyre, F., 1997. Mercury in th food web: accumulation and transfer mechanisms, Metal ions in biological systems. Marcel Dekker, inc., New York, pp. 289-319.
- Branco, V., Vale, C., Canario, J., Neves dos Santos, M., 2007. Mercury and selenium in blue shark (*Prionace glauca*, L.1758) and swordfish (*Xiphias gladius*, L.1758) from two areas of the Atlantic Ocean. *Environmental Pollution*, 150: 373-380.
- Bridges, C.C., Zalups, R.K., 2010. Transport of inorganic mercury and methylmercury in target tissues and organs. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 13(5): 385-410.
- Celo, V., Lean, D.R.S., Scott, S.L., 2006. Abiotic methylation of mercury in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*, 368: 126-137.
- Ciesielski, T., Pastukhov, M.V., Szefer, P., Jenssen, B.M., 2010. Bioaccumulation of mercury in the pelagic food chain of the Lake Baikal. *Chemosphere*, 78: 1378-1384.
- Clarkson, T.W., Magos, L., 2006. The Toxicology of Mercury and Its Chemical Compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, 36: 609-662.
- Clarkson, T.W., Vyas, J.B., Ballatori, N., 2007. Mechanisms of Mercury Disposition in the Body. *American Journal of Industrial Medecine*, 50: 757-764.
- Compeau, G.C., Bartha, R., 1985. Sulfate-Reducing Bacteria: Principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(2): 498-502.
- Das, R., Salters, V.J.M., Odom, A.L., 2009. A case for in vivo mass-independant fractionation of mercury isotopes in fish. *Geochemistry Geophysics Geosystems*, 10(11).
- Eagles-Smith, C.A., Ackerman, J.T., Yee, J., Adelsbach, L., 2009. Mercury demethylation in waterbirds livers: dose-response thresholds and differences among species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(3): 568-577.
- Epov, V.N. et al., 2010. Approach to measure Isotopic Ratios in Species Using Multicollector-ICPMS Coupled with Chromatography. *Analytical Chemistry*, 82(13): 5652-5662.
- Estrade, N., Carignan, J., Sonke, J.E., Donard, O.F.X., 2009. Mercury isotope fractionation during liquid-vapor evaporation experiments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 73: 2693-2711.
- Fitzgerald, W.F., Lamborg, C.H., Hammerschmidt, C.R., 2007. Marine Biogeochemical Cycling of Mercury. *Chemical Reviews*, 107(2): 641-662.
- Gillooly, J.F., Brown, J.H., West, G.B., Savage, V.M., Charnov, E.L., 2001. Effects of Size and Temperature on Metabolic Rate. *Science*, 293: 2248-2251.

Chapitre 6. L'étude de la composition isotopique des différentes formes chimiques du mercure dans les tissus de mammifères aquatiques permet d'établir le lien entre l'exposition au méthylmercure et la réponse métabolique

- Harris, H.H., Pickering, I.J., George, G.N., 2003. The Chemical Form of Mercury in Fish. *Science*, 301: 1203.
- Ikemoto, T. et al., 2004. Comparison of trace element accumulation in Baikal seals (*Pusa sibirica*), Caspian seals (*Pusa caspica*) and northern fur seals (*Callorhinus ursinus*). *Environmental Pollution*, 127: 83-97.
- Jensen, S., Jernelov, A., 1969. Biological Methylation of Mercury in Aquatic Organisms. *Nature*, 223: 753-754.
- Jimenez-Moreno, M., Perrot, V., Epov, V.N., Monperrus, M., Amouroux, D., 2013. Chemical kinetic isotope fractionation of mercury during abiotic methylation of Hg(II) by methylcobalamin in aqueous chloride media *Chemical Geology*, 336: 26-36.
- Koeman, J.H., Peeters, W.H.M., Koudstaal-Hol, C.H.M., Tjioe, P.S., De Goeij, J.J.M., 1973. Mercury-Selenium Correlations in Marine Mammals. *Nature*, 245: 385-386.
- Korbas, M. et al., 2010. The Chemical Nature of Mercury in Human Brain Following Poisoning or Environmental Exposure. *Chemical Neuroscience*, 1: 810-818.
- Kritee, K., Barkay, T., Blum, J.D., 2009. Mass dependant stable isotope fractionation of mercury during mer mediated microbial degradation of monomethylmercury. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 73: 1285-1296.
- Kritee, K., Blum, J.D., Barkay, T., 2008. Mercury stable isotope fractionation during reduction of Hg(II) by different microbial pathways. *Environmental Science & Technology*, 42(24): 9171-9177.
- Kritee, K., Blum, J.D., Reinfelder, J.R., Barkay, T., 2013. Microbial stable isotope fractionation of mercury: a synthesis of present understanding and future directions. *Chemical Geology*, 336: 13-25.
- Kwon, S.Y. et al., 2012. Absence of Fractionation of Mercury Isotopes during Trophic Transfer of Methylmercury to Freshwater Fish in Captivity. *Environmental Science & Technology*, 46(14): 7527-7534.
- 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. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(10): 2322-2330.
- Laffont, L. et al., 2009. Anomalous Mercury Isotopic Compositions of Fish and Human Hair in the Bolivian Amazon. *Environmental Science & Technology*, 43(23): 8985-8990.
- Laffont, L. et al., 2011. Hg Speciation and Stable Isotope Signatures in Human Hair As a Tracer for Dietary and Occupational Exposure to Mercury. *Environmental Science & Technology*, 45(23): 9910-9916.
- Lockhart, W.L. et al., 2005. Concentrations of mercury in tissues of beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from several communities in the Canadian Arctic from 1981 to 2002. *Science of the Total Environment*, 351-352: 391-412.
- Morel, F.M.M., Kraepiel, A.M.L., Amyot, M., 1998. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. *Annual review of ecology and systematics*, 29: 543-566.
- Oremland, R.S., Culbertson, C.W., Winfrey, M.R., 1991. Methylmercury Decomposition in Sediments and Bacterial Cultures: Involvement of Methanogens and Sulfate Reducers in Oxidative Demethylation. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(1): 130-137.
- Pedrero, Z., Mounicou, S., Monperrus, M., Amouroux, D., 2011. Investigation of Hg species binding biomolecules in dolphin liver combining GC and LC-ICP-MS with isotopic tracers. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 26: 187-194.
- Pedrero Zayas, Z. et al., 2014. Hemoglobin as a major binding protein for methylmercury in white-sided dolphin liver. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406: 1121-1129.

Chapitre 6. L'étude de la composition isotopique des différentes formes chimiques du mercure dans les tissus de mammifères aquatiques permet d'établir le lien entre l'exposition au méthylmercure et la réponse métabolique

- Perrot, V. et al., 2012. Higher mass-independent fractionation of methylmercury in the pelagic food web of Lake Baikal (Russia). *Environmental Science & Technology*, 46(11): 5902-5911.
- Rodriguez-Gonzalez, P. et al., 2009. Species-Specific Stable Isotope Fractionation of Mercury during Hg(II) Methylation by an Anaerobic Bacteria (*Desulfobulbus propionicus*) under Dark Conditions. *Environmental Science & Technology*, 43(24): 9183-9188.
- Seibel, B.A., Drazen, J.C., 2007. The rate of metabolism in marine animals: environmental constraints, ecological demands and energetic opportunities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 362: 2061-2078.
- Seixas, T.G. et al., 2008. Total mercury, organic mercury and selenium in liver and kidney of a South American coastal dolphin. *Environmental Pollution*, 154: 98-106.
- Senn, D.B. et al., 2010. Stable Isotope (N, C, Hg) Study of Methylmercury Sources and Trophic Transfer in the Northern Gulf of Mexico. *Environmental Science & Technology*, 44(5): 1630-1637.
- Sherman, L.S., Blum, J.D., Franzblau, A., Basu, N., 2013. New Insight into Biomarkers of Human Mercury Exposure Using Naturally Occuring Mercury Stable Isotopes. *Environmental Science & Technology*, 47(7): 3403-3409.
- Sonke, J.E., 2011. A global model of mass independent mercury stable isotope fractionation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75(16): 4577-4590.
- Sonne, C. et al., 2009. A study of metal concentrations and metallothionein binding capacity in liver, kidney and brain tissues of three Arctic seal species. *Science of the Total Environment*, 407: 6166-6172.
- Suda, I., Hirayama, K., 1992. Degradation of methyl and ethyl mercury into inorganic mercury by hydroxyl radical produced from rat liver microsomes *Archives of Toxicology*, 66: 398-402.
- Suda, I., Suda, M., Hirayama, K., 1993. Phagocytic cells as a contributor of In Vivo degradation of alkyl mercury. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 51(3): 394-400.
- Wagemann, R., Trebacz, E., Boila, G., Lockhart, W.L., 1998. Methylmercury and total mercury in tissues of arctic marine mammals. *Science of the Total Environment*, 218: 19-31.
- Wagemann, R., Trebacz, E., Boila, G., Lockhart, W.L., 2000. Mercury species in the liver of ringed seals. *Science of the Total Environment*, 261: 21-32.
- Watanabe, I. et al., 1998. Age-Dependent Accumulation of Heavy metals in Baikal Seal (*Phoca sibirica*) from the Lake Baikal. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 35: 518-526.
- Weihe, P. et al., 2002. Neurobehavioral Performance of Inuit Children with Increased Pre-natal Exposure to Methylmercury. *International Journal of Circumpolar Health*, 61: 41-49.
- Wood, J.M., Kennedy, F.S., Rossen, C.G., 1968. Synthesis of methyl-mercury compounds by extracts of a methanogenic bacterium. *Nature*, 220: 173-175.
- Woshner, V. et al., 2008. Mercury and Selenium in Blood and Epidermis of Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) from Sarasota Bay, FL: Interaction and Relevance to Life History and Hematologic Parameters. *Ecohealth*, 5: 360-370.
- Woshner, V. et al., 2002. Distribution of Inorganic Mercury in Liver and Kidney of Beluga and Bowhead Whales Through Autometallographic Development of Light Microscopic Tissue Sections. *Toxicologic Pathology*, 30(2): 209-215.
- Yin, R., Feng, X., Shi, W., 2010. Application of the stable-isotope system to the study of sources and fate of Hg in the environment: A review. *Applied Geochemistry*, 25: 1467-1477.

Chapitre 6. L'étude de la composition isotopique des différentes formes chimiques du mercure dans les tissus de mammifères aquatiques permet d'établir le lien entre l'exposition au méthylmercure et la réponse métabolique

- Yoshii, K. et al., 1999. Stable isotope analyses of the pelagic food web in Lake Baikal. *Limnology and Oceanography*, 44(3): 502-511.
- Zheng, W., Foucher, D., Hintelmann, H., 2007. Mercury isotope fractionation during volatilization of Hg(0) from solution into the gas phase. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 22: 1097-1104.
- Zheng, W., Hintelmann, H., 2009. Mercury Isotope Fractionation during photoreduction in natural water is controlled by its Hg/DOC ratio. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 73: 6704-6715.
- Zheng, W., Hintelmann, H., 2010. Isotope Fractionation of Mercury during Its Photochemical Reduction by Low-Molecular-Weight Organic Compounds. *The Journal of Physical Chemistry A*, 114(12): 4246-4253.

Supporting information:

Mercury (Hg) compounds specific stable isotopic analysis of aquatic mammal tissues provides new insights linking ecosystem MMHg exposure to metabolic turnover, detoxification and trophic transfer

*Vincent Perrot^a, Jeremy Masbou^b, Mikhail V. Pastukhov^c, Vladimir N. Epov^a, David Point^b,
Sylvain Bérail^a, Paul R. Becker^d, Jeroen E. Sonke^b, and David Amouroux^a*

^aLaboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement, Institut des Sciences Analytiques et de Physico-chimie pour l'Environnement et les Matériaux, IPREM UMR-5254, CNRS-UPPA, Hélioparc, 2 Avenue du Président Pierre Angot, Pau, 64053, France

^bLaboratoire Géosciences Environnement Toulouse, Observatoire Midi-Pyrénées CNRS-IRD-Université de Toulouse 3, 14 avenue Edouard Belin, Toulouse, 31400, France

^cLaboratory of geochemical mapping and monitoring, Institute of Geochemistry SB RAS, 1A Favorskogo Street, PB-304, Irkutsk, 664033, Russia

^dNational Institute of Standards and Technology, Hollings Marine Laboratory, Charleston, South Carolina, USA

RECEIVED DATE

*Author for correspondence: perrot@magnet.fsu.edu

Description of the samples, sampling and storing procedures

Beluga whales (*Delphinapterus leucas*) occur throughout northern and western Alaska and are an important subsistence resource for Alaska native people. Beluga liver samples come from the Alaska Marine Mammal Tissue Archival Project (AMMTAP), led by the National Biomonitoring Specimen Bank (NBSB) at the National Institute of Standards and Technology (NIST, Charleston, SC, USA). This project began in 1987 and consists in sampling and archiving mammal tissues collected from stranding or Inuit subsistence hunting in the Alaskan Arctic. For this study, we disposed of 11 beluga livers from the Eastern Chukchi Sea stock sampled at Point Lay, North Alaska (Figure S5a). All the belugas have been harvested during the feeding season from June 30th through July 11th of 1990, 1996 and 1999. A very strict sampling protocol followed by cryogenic homogenization has been undertaken to minimize contaminations (Zeisler et al., 1983). Once received, samples were stored in -80°C freezer until their analysis. Age of beluga individuals has been estimated counting growth rings in a thin longitudinal section taken from the middle of the mandibular tooth.

Seal tissues (*Phoca sibirica*) were collected from seals sampled in the southern and central basins of Lake Baikal in 2008-2010 (Figure S5b). Four seals of the age 1-1.5 months (P-8, P-10, P-12 and P-14) and one adult female (PP-17) were obtained by hunters during the official spring hunting season. Young males (P-15 and P-16) were inadvertently caught in fishing nets during the autumn-winter period. Several biometric parameters of the seals (sex, length, age) are presented in Dataset S1. Sampling of the seal tissues have been done in the field, followed by freezing at -18°C and transportation (frozen) to the laboratory of the Institute of Geochemistry SB RAS. In the clean laboratory, samples were weighed on the analytical balances and placed into the 1L flask (cleaned by 10% HNO₃, 10% HCl and MilliQ water) at -40°C. Frozen samples were freeze-dried at -80°C during 48h. Freeze-dried samples were weighed to estimate the loss of the moisture. Final samples were placed into double zip-lock bags and kept in a refrigerating chamber.

Sample preparation and analytical techniques for stable isotope ratios measurements

Total Hg isotopic composition

All Hg isotopic ratios were measured by cold vapour generation (CVG) coupled to MC-ICP-MS either at LCABIE in Pau (HR Nu Plasma, Nu Instruments, Wrexham, UK) or at GET in Toulouse (Neptune, Thermo, Bremen, Germany). The instrumental mass bias was corrected using Tl (NIST SRM 997, simultaneously introduced as an internal standard) and the exponential law. All samples are measured following a sample/standard bracketing sequence. A delta notation (‰) relative to the reference standard NIST SRM 3133 is used to express the Hg isotopic composition (Blum and Bergquist, 2007):

Chapitre 6. L'étude de la composition isotopique des différentes formes chimiques du mercure dans les tissus de mammifères aquatiques permet d'établir le lien entre l'exposition au méthylmercure et la réponse métabolique

$$\delta^{xxx}\text{Hg} = [(\text{xxxHg} / ^{198}\text{Hg})_{\text{sample}} / (\text{xxxHg} / ^{198}\text{Hg})_{\text{NIST 3133}} - 1] \times 1000 \quad (4)$$

where xxx is 204, 202, 201, 200 or 199 are the different Hg isotopes measured and $(\text{xxxHg}/^{198}\text{Hg})_{\text{NIST3133}}$ is the average of the two bracketing standards. The mass independent fractionation (MIF) is expressed as follows:

$$\Delta^{199}\text{Hg} = \delta^{199}\text{Hg} - 0.252 \times \delta^{202}\text{Hg} \quad (5)$$

$$\Delta^{200}\text{Hg} = \delta^{200}\text{Hg} - 0.502 \times \delta^{202}\text{Hg} \quad (6)$$

$$\Delta^{201}\text{Hg} = \delta^{201}\text{Hg} - 0.752 \times \delta^{202}\text{Hg} \quad (7)$$

$$\Delta^{204}\text{Hg} = \delta^{204}\text{Hg} - 1.493 \times \delta^{202}\text{Hg} \quad (8)$$

In both laboratories, extraction yields have been checked using CVG-MC-ICP-MS 202Hg isotope signals (Volts), and sample-standard NIST 3133 were matched to within 15%. External reproducibility has been evaluated by the repeated analysis of reference materials such as whale liver (QC03LH03), dogfish liver (NRC CNRC DOLT-4), tuna fish muscle (BCR-CRM 464), and UM-Almadén during each session of analysis (Table S3).

Sample preparation at IPREM-LCABIE (Pau, France)

Seal tissue samples were mixed with 5 mL of HNO₃ and 1.25 mL of HCl and left overnight. Then, 5 mL of deionized water was added and this mixture was heated in a digiPREP system (SCP Science, France) at 80°C during 4 hrs (90 min of ramp and 2.5 hrs of heating time). For total conversion of all the Hg to Hg(II) 1mL of freshly prepared BrCl was added. To remove an excess of BrCl from the solution, 0.5 mL of 30% hydroxylamine was added before analysis. The final solution was diluted 5 times. A home-made Cold Vapor Generator (CVG) was used as sample introduction system in MC-ICPMS, in which a sample is mixed with a SnCl₂ solution (SnCl₂ 3% w/v, HCl 10% v/v). A 10 µg.L⁻¹ TI solution is introduced in a dry aerosol form with a DSN100 desolvating nebulizer (Nu Instruments, Wrexham, UK) and is mixed with the sample Hg vapour in a double entry plasma torch. Hg concentrations of the analysed solutions vary from 0.5 to 2 µg.L⁻¹. Blanks solutions were measured before each standard and sample and signals were subtracted using “on peak zero” signals.

Sample preparation at GET (Toulouse, France)

For the digestion of beluga whale samples, 5 mL of bi-distilled nitric acid (15N) was added to 0.2g of fresh frozen sample in a 50 mL Pyrex vessel, and closed by a Teflon cap. Complete Hg extraction was made with a CEM Discover microwave (180°C, 225 PSI, 10 min). Tests was carried out with or without BrCl reagent addition (0.1 mL, Method EPA 1631) and no significant differences has been observed in terms of final HgT recoveries (>90%). The mixtures were finally diluted in an

Chapitre 6. L'étude de la composition isotopique des différentes formes chimiques du mercure dans les tissus de mammifères aquatiques permet d'établir le lien entre l'exposition au méthylmercure et la réponse métabolique

inverse aqua regia (3 HNO₃ : 1 HCl, 20 vol.% MilliQ water) for analysis. Final solutions contained 2.5 or 5 ng.g⁻¹ of total Hg concentration and were introduced in a Thermo Finnigan Neptune MC-ICP-MS by using a Cold Vapor Generation system (HGX200, Cetac).

Sample preparation and analytical techniques for Hg species-specific stable isotope composition analysis (Hg-CSIC) at IPREM-LCABIE (Pau, France)

About 200 mg of dried sample was digested in 5 mL of 25% Tetra Methyl Ammonium Hydroxide under soft microwave-assisted extraction (CEM discover, 75°C, 4 min). Between 1 to 5 mL of the extract was derivatized in 5 mL acetate buffer (pH=3.9) with about 0.5-1 mL of sodium-tetrapropylborate (NaBPr₄ 1%) into 1 mL of organic phase (hexane) after 5 minutes of hand shaking. A preconcentration step under a gentle Ar flux has been applied for low concentration samples in order to reach a final concentration of 20 to 200 µg.L⁻¹ of both Hg species in the organic phase. 3µL of samples was injected into a gas chromatograph (Thermo Focus, see parameters below). In order to measure Hg species-specific isotopic ratios, the gas chromatograph was hyphenated to the MC-ICP-MS under wet plasma conditions (Epov et al., 2008) (see parameters below). Here a 200 µg.L⁻¹Tl solution is introduced as an internal standard via a 200 µL.min⁻¹ micro-concentric nebulizer combined to a cinnabar spray chamber. A double entry plasma torch was used to mix Tl aerosol and GC flow. Isotopic ratios of both Hg(II) and MeHg were measured with a species-specific sample-standard bracketing sequence. The Time Resolved Analysis mode (TRA) was used to acquire the transient signals. The data treatment strategy used to calculate Hg isotopic ratios is the Linear Regression Slope (LRS) method described by Epov et al. (Epov et al., 2010).

Quantification of Hg species by isotope dilution GC-ICPMS

Hg species quantification by isotope dilution was found in good agreement with total Hg concentration measured with DMA-80 analyser (Milestone, USA) for all samples and for certified biological reference materials (tuna fish muscle BCR464, dogfish liver DOLT-4 and pigmy sperm whale liver NIST QC03LH3), as reported in Table S3 and Dataset S1. An enriched isotope pattern deconvolution method (Rodriguez-Gonzalez et al., 2005) was used to investigate species interconversion artefacts during the analytical procedures. In general the transformation artefacts were low and occurred unpredictably in some hair and kidney samples (Dataset S1). Typical detection limits (DL) were 0.7% for the demethylation and 0.3% for the methylation (Navarro et al., 2011). The use of the isotope dilution technique associated with GC-ICPMS thus represents a valuable tool for the accurate measurement of Hg species in complex biological tissues, confirming earlier results (Monperrus et al., 2008).

Precision and accuracy of Hg stable isotope ratios measurements

Measurements of total Hg isotopic composition by CVG-MC-ICPMS of external standards (UM Almadén, BCR464, DOLT-4, QC03LH3) were processed within all the analytical sessions. Delta values obtained for BCR-464 and Um-Almadén were in good agreement with published values (Bergquist and Blum, 2007; Perrot et al., 2010; Perrot et al., 2012) within the analytical uncertainties. We used UM-Almadén (n = 21) and whale liver QC03LH3 (n = 27) long-term reproducibility to express the uncertainty (2SD) on the seals and belugas measurements, respectively, because they had higher number of measurements than had BCR-464 (n = 7) and DOLT-4 (n = 4) (Table S3).

For Hg-CSIA measured by GC-MC-ICPMS, the considerably higher amount of sample derivatized (~5 mL) compared to Hg speciation measurements by GC-ICPMS (0.02 to 0.5 mL), induced a lower derivatization yield of the Hg species. This was observed comparing transient signal intensities between samples and NIST 3133, even with higher amounts of NaBPr4 (1 mL) added to ensure efficient derivatization. Although one study suggested the possible occurrence of isotope fractionation artefact during the ethylation step (Yang and Sturgeon, 2009), this artefact was not found to induce a significant bias within the precision of the measurements performed by GC-MC-ICP-MS. To investigate the hypothesis of isotopic fractionation artefacts during the sample preparation, we compared the isotopic signatures obtained by GC-MC-ICPMS and CVG-MC-ICPMS in all samples and standards. For the isotopic mass-balance to be conservative, Hg total isotopic composition, Hg CSSIC and Hg species fractions must be related by the following equation:

$$\delta^{\text{xxx}}\text{Hg} = \delta^{\text{xxx}}\text{Hg(II)} * f(\text{Hg(II)}) + \delta^{\text{xxx}}\text{MMHg(II)} * f(\text{MMHg}) \quad (1)$$

where f is the fraction of the Hg species considered ($f(\text{Hg(II)}) + f(\text{MMHg})=1$); $\delta^{\text{xxx}}\text{Hg}$ is the total Hg isotope composition measured by CVG-MC-ICPMS; $\delta^{\text{xxx}}\text{Hg(II)}$ and $\delta^{\text{xxx}}\text{MMHg}$ are the species specific stable isotope composition of Hg(II) and MMHg measured by GC-MC-ICPMS, respectively.

Within the analytical uncertainties of the method (2SD), the isotopic mass-balance was conservative for all samples and standards, as shown in Figure S1a ($\delta^{202}\text{Hg}$) and Figure S1b ($\Delta 201\text{Hg}$). The only exception was sample B-455 (beluga liver) where MMHg isotope composition has not been measured due to the very low MMHg contents ($f(\text{MMHg}) = 0.01$). Results of Hg content and isotopic composition (total and species-specific) for all samples are listed in Table S2. Since all Hg-CSIA (i.e. $\delta^{\text{xxx}}\text{Hg(II)}$ and $\delta^{\text{xxx}}\text{MMHg}$) and the total Hg isotope ratio fell in the isotopic mass balance mixing equation given the analytical uncertainties of each method, we conclude that GC-MC-ICP-MS provide a suitable tool for measuring Hg compounds-specific isotopic composition in complex biological tissues. Therefore, variations in Hg-CSIA in the different mammal tissues discussed in the manuscript

and the SI sections can be related with confidence to internal biological/biochemical and/or external geochemical processes.

Estimation of in vivo demethylation extent in Baikalian seals

Overall, we observed homogeneous Hg MDF CSIA among the various tissues of the different seals ($\delta^{202}\text{MMHg} = 2.47 \pm 0.47\text{‰}$, $n = 10$ and $\delta^{202}\text{Hg(II)} = -0.73 \pm 0.32\text{‰}$, $n = 10$). Using total Hg stable isotopes measurements and fraction of Hg(II) in the different samples (Figure 1), we calculated the slope from seal samples and determined MMHg and Hg(II) pools CSIA ($\delta^{202}\text{MMHg} = 2.57 \pm 0.13\text{‰}$ and $\delta^{202}\text{Hg(II)} = -1.00 \pm 0.13\text{‰}$). Hence, measured Hg-CSIA (GC-MC-ICPMS) and calculated Hg-CSIC (from Figure 1 slope) were in agreement. By further observing that both Hg(II) and MMHg had $\Delta^{199}\text{Hg}:\Delta^{201}\text{Hg}$ ratios close to 1.3, we concluded that both Hg species in internal seal tissues had same origin (i.e. residual MMHg from photodemethylation in the water column before incorporation in the food web (Bergquist and Blum, 2007)). This is consistent with the fact that MMHg is the Hg compound predominantly absorbed via fish consumption (Morel et al., 1998). The observed important Hg(II) fractions in several tissues (especially liver and kidney) can be then attributed to in-vivo subsequent demethylation (Wagemann et al., 1998). Hence, Hg(II) and MMHg proportions in seal tissues are unlikely caused by differences in their accumulation properties from food but are rather product and residual Hg species fractions, respectively, of in vivo demethylation. We estimated the stable isotope MDF enrichment factor ($\epsilon_{\text{react-prod}}$, ‰) of in vivo demethylation, which is directly given by the slope from Figure 1 (solid line), or by the difference of the MMHg and Hg(II) pools calculated from this slope, as:

$$\epsilon_{\text{MMHg-Hg(II)}} = \delta^{202}\text{MMHg} - \delta^{202}\text{Hg(II)} \quad (\text{‰}) \quad (2)$$

The calculated enrichment factor was $\epsilon_{\text{MMHg-Hg(II)}} = 3.57 \pm 0.18\text{‰}$. We further compared the total Hg isotope composition in seal muscle ($\delta^{202}\text{Hg} = 1.83 \pm 0.29\text{‰}$, $n = 7$) and in their prey (sculpin fish, $\delta^{202}\text{Hg} = 0.85 \pm 0.22\text{‰}$, $n = 26$) (Perrot et al., 2012). Using the enrichment factor of in vivo demethylation, we were able to estimate the fraction of MMHg in seal muscle that is residual MMHg from in vivo demethylation - we make here the assumption that the fraction of MMHg in the seal prey (sculpin fish) is 1. If all MMHg in the prey is directly transferred to the seal muscle without undergoing any demethylation step, the seal and prey muscle should have the same total isotopic composition (i.e. $\delta^{202}\text{Hg}_{\text{seal muscle}} = \delta^{202}\text{Hg}_{\text{prey}}$). On the other hand, if 100% of the MMHg in the seal muscle is residual MMHg from in vivo demethylation step, the seal muscle should have the total Hg isotopic composition of the prey in addition to the enrichment factor (i.e. $\delta^{202}\text{MMHg}_{\text{seal muscle}} = \delta^{202}\text{Hg}_{\text{prey}} + 3.57$). The fraction of MMHg in seal muscle that is residual MMHg from in vivo demethylation ($f(\text{MMHg}_{\text{res}})$) is given by the following equation:

$$f(\text{MMHg}_{\text{res}}) = (\delta^{202}\text{MMHg}_{\text{seal muscle}} - \delta^{202}\text{Hg}_{\text{prey}}) / \epsilon_{\text{MMHg-Hg(II)}} \quad (3)$$

Therefore, in Baikalian seal muscle, we estimated a $f(\text{MMHg}_{\text{res}})=0.45$ (i.e. $(2.47-0.85) / 3.57$). In other words, ~45% of the MMHg in seal muscles is residual MMHg from in vivo demethylation step (likely in liver) that is subsequently transferred to muscle (probably via blood transporters (Bridges and Zalups, 2010)). Conversely, due to the very low Hg(II) amounts coming from food relative to MMHg, the Hg(II) found in the seal muscle is likely to be mainly (close to 100%) Hg(II) produced during in vivo demethylation (even if the majority of this Hg(II) do not leave the liver and stay inside as HgSe insoluble complexes (Wagemann et al., 1998)).

Hair Hg-CSIA

This unique sample have not been included in the manuscript Hg CSIC MIF discussion because it is not an internal tissue and may thus be exposed to external transformations in the water column (Hg adsorption, Hg absorption, Hg photoreduction). Furthermore, it is also likely that hair do no integrate the same period of Hg exposure as do internal organs¹¹. While MIF of both Hg(II) and MMHg species was not significantly different from the MIF of the total Hg in the different internal tissues of seals (i.e. liver, kidney, muscle, pancreas, diaphragm, thick intestine), we measured strong differences among Hg species anomalies ($\Delta^{201}\text{Hg}$ or $\Delta^{199}\text{Hg}$) in the hair, with higher values for MMHg than for Hg(II) ($\Delta^{199}\text{Hg} = 5.94 \pm 0.14\text{‰}$ and $1.05 \pm 0.21\text{‰}$ (2SD on analysis triplicates), respectively). This suggests that seal hair may reflect some photochemical process occurring on the hair during the mammal lifespan, strongly indicated by the residual MMHg enriched in odd isotopes relative to Hg(II) following photodemethylation patterns. Alternatively, it could also be the result of external supply of different Hg species from the water column adsorbed onto the hair. However, the photodemethylation explanation is privileged because of the MIF of total Hg similarity between the hair and the other organs such as liver and muscle, suggesting no external Hg source. The hair ratio $\Delta^{199}\text{Hg}:\Delta^{201}\text{Hg}$ of total Hg, MMHg and Hg(II) is 1.21, 1.20 and 1.24, respectively, indicating that both Hg species originate predominantly from MMHg photodemethylation. We thus hypothesized that the different Hg species anomalies observed in the hair come directly from MMHg photodemethylation, at the hair surface, of MMHg previously accumulated in the hair via trophic transfer. This is the best assumption to explain why Hg total MIF is the same than in the other organs and thus be used to track Hg source and why MMHg anomaly ($\Delta^{201}\text{Hg}$) is significantly higher (about 4‰) than Hg(II) anomaly. Additional studies with larger number of samples are clearly needed to improve and corroborate such hypothesis.

Bibliography

- Bergquist, B.A., Blum, J.D., 2007. Mass-dependant and α -independent fractionation of Hg isotopes by photoreduction in aquatic systems. *Science*, 318: 417-420.
- Blum, J.D., Bergquist, B.A., 2007. Reporting of variations in the natural isotopic composition of mercury. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388: 353-359.
- Bridges, C.C., Zalups, R.K., 2010. Transport of inorganic mercury and methylmercury in target tissues and organs. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 13(5): 385-410.
- Epov, V.N. et al., 2010. Approach to measure Isotopic Ratios in Species Using Multicollector-ICPMS Coupled with Chromatography. *Analytical Chemistry*, 82(13): 5652-5662.
- Epov, V.N. et al., 2008. Simultaneous Determination of Species-Specific Isotopic Composition of Hg by Gas Chromatography Coupled to Multicollector ICPMS. *Analytical Chemistry*, 80(10): 3530-3538.
- Laffont, L. et al., 2009. Anomalous Mercury Isotopic Compositions of Fish and Human Hair in the Bolivian Amazon. *Environmental Science & Technology*, 43(23): 8985-8990.
- Magos, L., Clarkson, T.W., 2008. The assessment of the contribution of hair to methyl mercury excretion. *Toxicology Letters*, 182: 48-49.
- Monperrus, M., Rodriguez-Gonzalez, P., Amouroux, D., Garcia Alonso, J.I., Donard, O.F.X., 2008. Evaluating the potential and limitations of double-spiking species-specific isotope dilution analysis for the accurate quantification of mercury species in different environmental matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(2): 655-666.
- Morel, F.M.M., Kraepiel, A.M.L., Amyot, M., 1998. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. *Annual review of ecology and systematics*, 29: 543-566.
- Navarro, P. et al., 2011. Simultaneous determination of mercury and butyltin species using a multiple species-specific isotope dilution methodology on the European, *Anguilla anguilla* glass eel and yellow eel. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*: in press.
- Perrot, V. et al., 2010. Tracing Sources and Bioaccumulation of Mercury in Fish of Lake Baikal-Angara River Using Hg Isotopic Composition *Environmental Science & Technology*, 44(21): 8030-8037.
- Perrot, V. et al., 2012. Higher mass-independent fractionation of methylmercury in the pelagic food web of Lake Baikal (Russia). *Environmental Science & Technology*, 46(11): 5902-5911.
- Rodriguez-Gonzalez, P., Rodriguez-Cea, A., Garcia Alonso, J.I., Sanz-Medel, A., 2005. Species-Specific Isotope Dilution Analysis and Isotope Pattern Deconvolution for Butyltin Compounds Metabolism Investigations. *Analytical Chemistry*, 77: 7724-7734.
- Wagemann, R., Trebacz, E., Boila, G., Lockhart, W.L., 1998. Methylmercury and total mercury in tissues of arctic marine mammals. *Science of the Total Environment*, 218: 19-31.
- Yang, L., Sturgeon, R.E., 2009. Isotopic fractionation of mercury induced by reduction and ethylation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(1): 377-385.
- Zeisler, R., Harrison, S.H., Wise, S.A., 1983. The Pilot national environmental specimen bank : analysis of human liver specimens. U.S. Government Printing Office. NBS SP 656, Washington, DC, 135 pp.

Chapitre 6. L'étude de la composition isotopique des différentes formes chimiques du mercure dans les tissus de mammifères aquatiques permet d'établir le lien entre l'exposition au méthylmercure et la réponse métabolique

Table S1: Total Hg isotopic ratio, total and Hg species concentration ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$, dw) in seal liver and muscle samples that have not been measured for Hg species-specific isotope ratio. Error on delta values are given by the long term reproducibility (2SD) of UM-Almadén ($n=21$, see table S3). Total Hg concentration is the sum of Hg(II) and MMHg concentration for each sample.

samples	[Hg(II)]		[MMHg]		[Hg]total	$\delta^{204}\text{Hg}$	$\delta^{202}\text{Hg}$	$\delta^{201}\text{Hg}$	$\delta^{200}\text{Hg}$	$\delta^{199}\text{Hg}$	$\Delta^{204}\text{Hg}$	$\Delta^{201}\text{Hg}$	$\Delta^{200}\text{Hg}$	$\Delta^{199}\text{Hg}$	
	mean	2 SD	mean	2 SD	mean										
Livers	P- 8 Li	529		188		717	0.94	0.71	4.43	0.45	5.24	-0.12	3.89	0.09	5.06
	P- 10 Li	271		219		489	1.87	1.32	5.05	0.75	5.47	-0.10	4.06	0.09	5.14
	P- 12 Li	163		133		296	1.31	0.94	4.41	0.55	4.94	-0.10	3.70	0.08	4.70
	P- 15 Li	7907	304	1091	94	8999	-0.79	-0.46	2.43	-0.18	3.40	-0.09	2.78	0.06	3.52
Muscles	P- 8 Mu	40	5	164	7	204	3.03	2.16	5.75	1.20	5.78	-0.20	4.13	0.11	5.24
	P- 10 Mu	25	2	113	1	139	2.47	1.75	5.21	0.96	5.42	-0.14	3.89	0.08	4.98
	P- 12 Mu	33	11	164	1	197	2.64	1.87	5.20	1.05	5.30	-0.15	3.79	0.11	4.83
	P- 14 Mu	26	1	133	16	159	2.50	1.73	5.21	0.95	5.36	-0.08	3.91	0.08	4.93
	P- 15 Mu	205	24	896	98	1101	2.17	1.60	3.90	0.90	3.81	-0.22	2.69	0.10	3.41
	P- 16 Mu	135	14	648	61	783	2.05	1.44	4.65	0.79	4.89	-0.11	3.56	0.07	4.53

Chapitre 6. L'étude de la composition isotopique des différentes formes chimiques du mercure dans les tissus de mammifères aquatiques permet d'établir le lien entre l'exposition au méthylmercure et la réponse métabolique

Table S2: Summary of the Hg species (Hg(II) and MMHg) and total Hg concentration in the different organs and tissues of the aquatic mammals, associated with their isotopic composition. Measurements of international standard reference material of fish tissues certified for MMHg and total Hg concentration are also included.

Sampling site	mammal	age	tissue	sample	Hg _{dw} (ng/g)	SD	fMMHg	SD	fHg(II)	SD	$\delta^{202}\text{Hg}$	$\delta^{203}\text{Hg}$	$\delta^{204}\text{Hg}$	$\delta^{205}\text{Hg}$	$\delta^{199}\text{Hg}$	$\delta^{201}\text{Hg}$	$\delta^{200}\text{Hg}$	$\Delta^{201}\text{Hg}$	$\Delta^{200}\text{Hg}$	$\Delta^{199}\text{Hg}$	$\Delta^{200}\text{Hg}$			
East. Chukchi Stock North Alaska	beluga	13	liver	B-134	[Hg] _{tot}	4246	162				-1.37	0.11	-1.07	0.13	-0.65	0.06	-0.31	0.11	-0.03	0.12	0.04	0.04	0.11	
					[MMHg]	851	29	0.20	0.01	0.80	0.03	0.03	0.35	0.01	2.44	0.15	1.17	-0.18	0.70	-0.02	2.18	0.13	0.99	-0.19
						3395	133				-1.85	0.31	-1.31	0.12	-0.86	0.18	1.21	0.36	0.08	0.15	0.07	0.12	1.68	0.39
						31160	1055				-1.31	0.11	-1.11	0.13	-0.65	0.06	-0.38	0.11	-0.13	0.12	0.01	0.04	-0.05	0.11
						2575	109				-0.91	0.17	-0.64	0.85	-0.76	2.59	-0.87	0.01	0.04	0.98	-0.30	2.68	-0.64	0.06
						28585	947				-1.69	0.40	-1.60	0.02	-0.89	0.34	-0.61	0.02	-0.32	0.32	-0.04	0.14	-0.18	0.08
						24972	2037				-0.97	0.11	-0.96	0.13	-0.51	0.06	-0.36	0.11	-0.23	0.12	-0.02	0.04	-0.11	0.11
						929	38				2.55	1.19	1.18	2.14	0.99	1.84	1.26	0.36	-0.74	1.70	-0.29	1.71	0.62	0.60
						24043	1999				-1.60	0.21	-1.51	0.17	-0.84	0.18	-0.32	0.36	-0.11	0.06	-0.04	0.22	0.09	0.31
						9311	985				-1.41	0.11	-1.21	0.13	-0.70	0.06	-0.45	0.11	-0.15	0.12	0.01	0.04	-0.10	0.11
						813	58				0.37	0.29	-0.30	1.21	0.00	0.62	-0.18	0.76	-0.58	1.34	-0.18	0.69	-0.27	0.69
						8498	927				-1.94	0.31	-1.69	0.20	-1.00	0.08	-0.51	0.25	-0.24	0.04	-0.03	0.10	-0.02	0.17
						80164	7121				-1.07	0.11	-1.03	0.13	-0.56	0.06	-0.41	0.11	-0.23	0.12	-0.02	0.04	-0.14	0.11
						978	181				-0.37	1.34	-0.06	0.56	-0.90	2.09	-0.84	0.94	0.21	0.45	-0.71	1.42	-0.75	0.60
						79187	6940				-0.93	0.37	-0.96	0.34	-0.42	0.20	-0.36	0.31	-0.26	0.11	0.04	0.03	-0.13	0.23
						53666	745				-0.92	0.11	-0.85	0.13	-0.45	0.06	-0.28	0.11	-0.16	0.12	0.01	0.04	-0.05	0.11
						1538	102				1.50	0.34	1.51	0.85	1.09	1.04	0.54	1.47	0.38	1.10	0.34	1.21	0.16	0.38
						52128	643				-1.03	0.23	-0.86	0.27	-0.53	0.27	-0.32	0.03	-0.09	0.27	-0.02	0.17	-0.06	0.06
						6029	166				-1.18	0.11	-0.94	0.13	-0.61	0.06	-0.22	0.11	-0.05	0.12	-0.01	0.04	0.08	0.11
						1268	47				0.89	0.04	0.52	0.15	0.27	0.37	0.43	0.66	-0.15	0.12	-0.17	0.35	0.21	0.67
						4761	119				-1.46	0.21	-1.13	0.03	-0.80	0.21	-0.18	0.08	-0.03	0.13	-0.07	0.11	0.18	0.03
						92341	2247				-0.80	0.11	-0.78	0.13	-0.39	0.06	-0.24	0.11	-0.17	0.12	0.02	0.04	-0.04	0.11
						1279	227				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
						91062	2020				-0.49	0.12	-0.50	0.02	-0.22	0.16	-0.13	0.17	-0.14	0.11	0.02	0.22	-0.01	0.20
					100512	9138				-0.99	0.11	-0.97	0.13	-0.49	0.06	-0.42	0.11	-0.23	0.12	0.00	0.04	-0.18	0.11	
					3384	152				1.43	0.05	0.80	0.40	1.79	2.19	0.72	0.81	-0.28	0.44	1.07	2.17	0.36	0.79	
					97128	8986				-0.72	0.41	-0.85	0.28	-0.42	0.32	-0.53	0.23	-0.31	0.18	-0.06	0.14	-0.34	0.13	
					10945	283				-1.06	0.11	-0.86	0.13	-0.61	0.06	-0.31	0.11	-0.06	0.12	-0.07	0.04	-0.04	0.11	
					765	81				1.30	-	1.42	-	0.07	-	0.18	-	0.44	-	-0.59	-	-0.15	-	
					10180	202				-1.26	0.07	-0.98	0.26	-0.65	0.25	-0.18	0.32	-0.03	0.21	-0.01	0.22	0.14	0.30	
					1481	41				-0.39	0.11	-0.07	0.13	-0.22	0.06	0.24	0.11	0.22	0.12	-0.02	0.04	0.34	0.11	
					573	26				1.56	0.46	1.45	0.53	0.69	0.22	0.85	0.76	0.28	0.49	-0.09	0.30	0.46	0.65	
					908	15				-0.86	0.43	-0.38	0.70	-0.40	0.37	0.44	0.39	0.27	0.43	0.03	0.17	0.65	0.28	
					18106	1209				-0.65	0.17	2.03	0.12	-0.23	0.11	3.05	1.10	2.52	0.09	0.09	0.06	3.21	0.08	
					1056	102				3.56	0.28	5.52	1.89	1.87	2.13	4.84	0.38	2.85	0.43	0.08	0.58	3.94	0.39	
					17050	1107				-0.94	0.22	2.06	0.10	-0.30	0.04	3.19	0.09	2.77	0.07	0.17	0.07	3.43	0.03	
					5465	263				-0.43	0.17	3.33	0.12	-0.16	0.11	4.55	0.10	3.66	0.09	0.05	0.06	4.66	0.08	
					1021	39				2.05	0.94	5.24	0.90	1.03	0.64	5.30	0.23	3.70	0.20	0.00	0.17	4.79	0.01	
					4445	224				-0.88	0.38	3.13	0.27	-0.42	0.35	4.71	0.10	3.79	0.01	0.03	0.16	4.94	0.00	
					852					1.10	0.17	4.69	0.12	0.63	0.11	5.18	0.10	3.86	0.09	0.08	0.06	4.91	0.08	
					357					2.68	0.07	5.50	0.77	1.34	0.19	5.46	0.55	3.48	0.71	0.00	0.22	4.78	0.53	
					494					-0.21	0.13	3.84	0.08	-0.16	0.07	5.22	0.03	4.00	0.02	-0.05	0.13	5.28	0.01	
					8400	139				-0.64	0.17	2.40	0.12	-0.23	0.11	3.48	0.10	2.88	0.09	0.09	0.06	3.64	0.08	
					634	1				2.19	0.64	4.91	0.59	1.12	0.47	5.06	0.02	3.27	0.11	0.02	0.15	4.51	0.14	
					7767	137				-1.01	0.06	2.32	0.09	-0.47	0.24	3.67	0.14	3.08	0.04	0.04	0.21	3.92	0.13	
					2492	84				-0.49	0.17	3.16	0.12	-0.17	0.11	4.35	0.10	3.53	0.09	0.07	0.06	4.47	0.08	
					609	8				1.79	0.47	4.47	0.46	0.85	0.35	4.72	0.38	3.12	0.11	-0.05	0.11	4.27	0.26	
					1883	76				-1.22	0.19	2.85	0.44	-0.61	0.13	4.28	0.35	3.77	0.30	0.00	0.22	4.59	0.39	
					874	73				2.35	0.17	4.90	0.12	1.26	0.11	4.61	0.10	3.13	0.09	0.08	0.06	4.02	0.08	
					760	69				2.56	0.54	5.12	0.35	1.27	0.53	4.80	0.00	3.19	0.05	-0.02	0.26	4.15	0.13	
					114	4				-0.43	0.61	3.52	1.09	0.01	0.97	4.47	0.03	3.84	0.64	0.23	0.67	4.58	0.18	
					733	26				1.22	0.17	3.78	0.12	0.71	0.11	4.07	0.10	2.86	0.09	0.09	0.06	3.76	0.08	
					396	12				2.54	0.11	4.86	0.30	1.31	0.06	4.43	0.57	2.95	0.38	0.03	0.12	3.79	0.60	
					337	15				-0.66	0.33	2.42	0.16	-0.28	0.28	3.71	0.19	2.91	0.09	0.05	0.11	3.87	0.27	
					542	21				1.01	0.17	3.55	0.12	0.59	0.11	3.81	0.10	2.79	0.09	0.08	0.06	3.56	0.08	
					290	9				2.31	0.18	4.88	0.05	1.22	0.16	4.42	0.39	3.14	0.09	0.06	0.06	3.84	0.34	
					252	12				-0.74	1.00	2.46	1.38	-0.36	0.57	3.40	0.38	3.02	0.63	0.01	0.07	3.59	0.13	
					1172	91				1.68	0.17	4.18	0.12	0.91	0.11	4.13	0.1							

Table S3. Total Hg isotopic composition measurements on different external standards with different matrices used for the long term reproducibility (2SD) on the total Hg isotope composition analysis of the biological samples.

sample	n	$\delta^{202}\text{Hg}$ (‰) ± 2SD	$\delta^{201}\text{Hg}$ (‰) ± 2SD	$\delta^{200}\text{Hg}$ (‰) ± 2SD	$\delta^{199}\text{Hg}$ (‰) ± 2SD	$\Delta^{201}\text{Hg}$ (‰) ± 2SD	$\Delta^{200}\text{Hg}$ (‰) ± 2SD	$\Delta^{199}\text{Hg}$ (‰) ± 2SD
UM-Almadén	21	-0.59	0.17	-0.47	0.12	-0.29	0.11	-0.17
CRM 464	7	0.82	0.26	2.60	0.14	0.49	0.17	2.61
DOLT 4	4	-0.35	0.20	0.71	0.06	-0.14	0.06	1.03
Whale liver	27	-0.79	0.11	0.35	0.13	-0.33	0.06	0.97

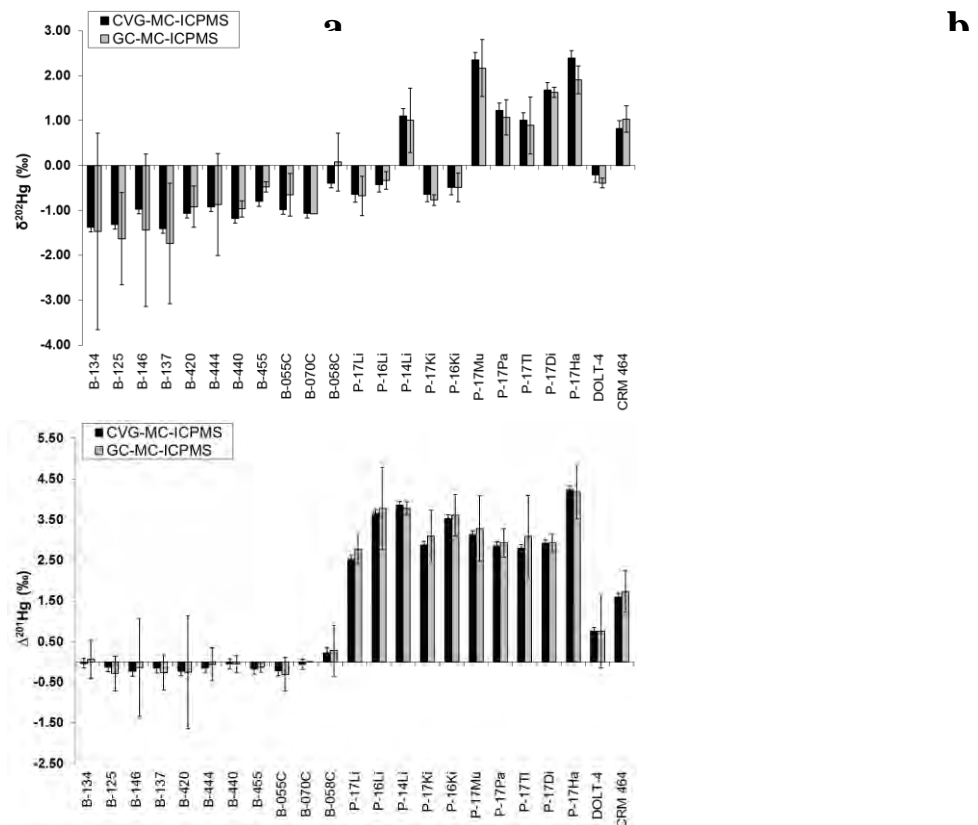


Figure S1: Comparison and validation of the Hg total isotopic composition of Hg in samples obtained by both CVG-MC-ICPMS and GC-MC-ICPMS for (a) MDF ($\delta^{202}\text{Hg}$) and (b) MIF ($\Delta^{201}\text{Hg}$). Hg total isotopic composition by GC-MC-ICPMS was calculated using mass-balance between Hg species fractions and Hg species-specific isotopic ratios (see eq. (1)). CRM=Certified Reference Material.

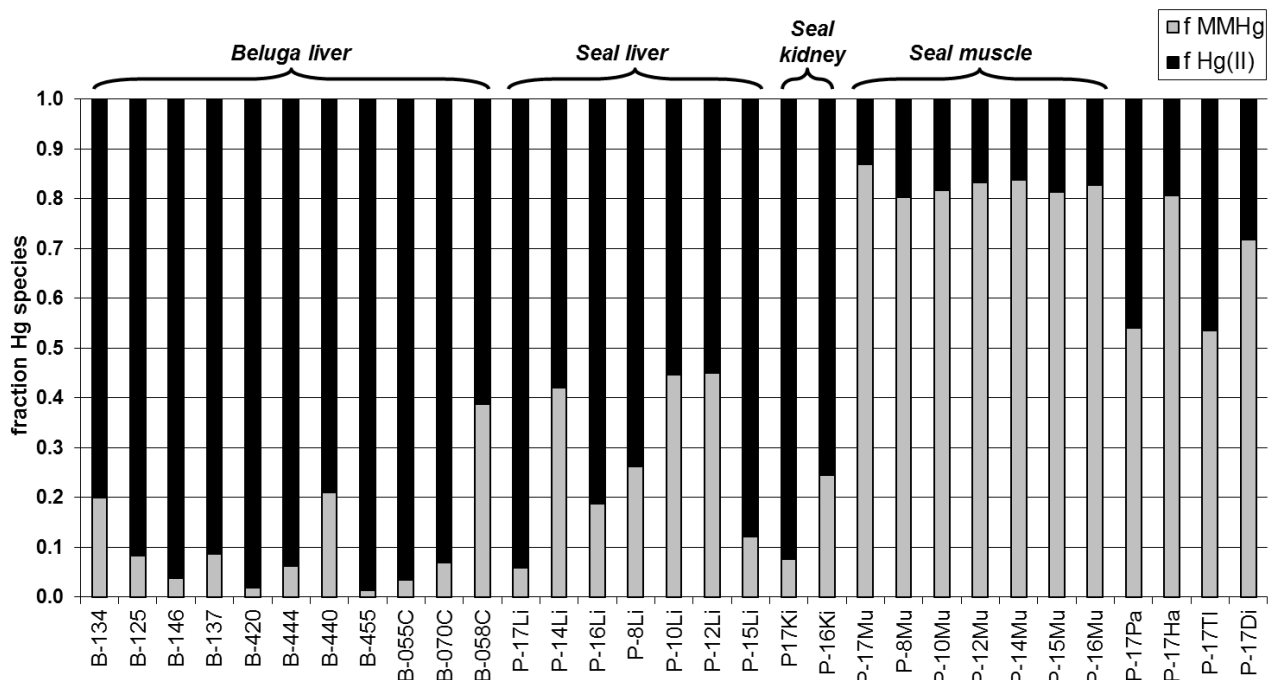


Figure S2: Repartition of Hg species (Hg(II) and MMHg) in different organs and tissues of belugas whales from Arctic Sea and seals from Lake Baikal. P17-Pa, P17-Ha, P17-TI and P17-Di are respectively pancreas, hair, thick intestine and diaphragm of the oldest seal (9 years) from Lake Baikal.

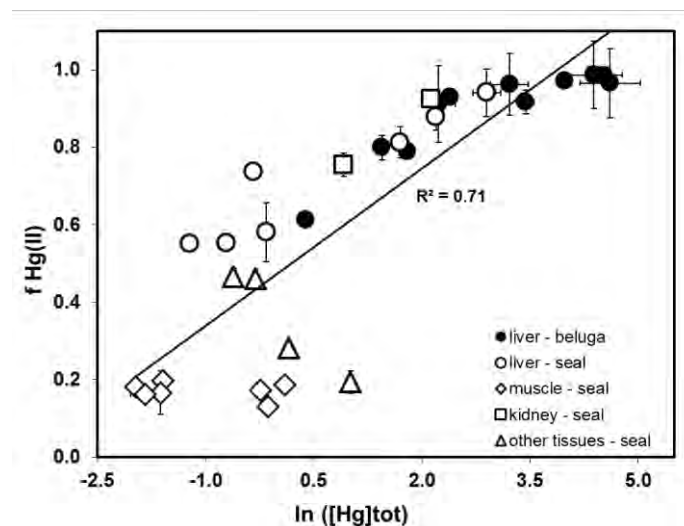


Figure S3: Fraction of inorganic mercury (Hg(II)) as a function of the total Hg concentration ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$, logarithmic representation) in tissues of the marine (beluga) and freshwater (seal) mammals. Positive linear correlation ($R^2=0.71$, $p<0.05$) is observed.

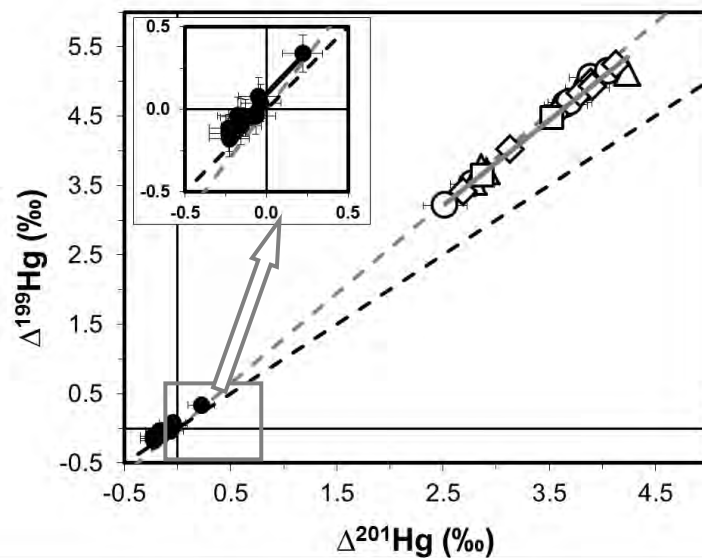


Figure S4: $\Delta^{199}\text{Hg}$ versus $\Delta^{201}\text{Hg}$ for total Hg in seal tissues and beluga livers. The grey dashed line represents the ratio $\Delta^{199}\text{Hg}:\Delta^{201}\text{Hg}$ expected from photodemethylation of MMHg, and the black dashed line represents the ratio $\Delta^{199}\text{Hg}:\Delta^{201}\text{Hg}$ expected from photoreduction of inorganic Hg(II)⁵. All seal tissues (open symbols) are located on the “MMHg photodemethylation slope” (linear regression ($n = 19$, slope=1.23, $R^2=0.99$, $p<0.01$), grey solid line). For beluga liver, the low MIF and associated uncertainties for each sample do not allow to conclude with confidence if samples lie either on the “Hg(II) photoreduction slope” or the “MMHg photodemethylation slope”.

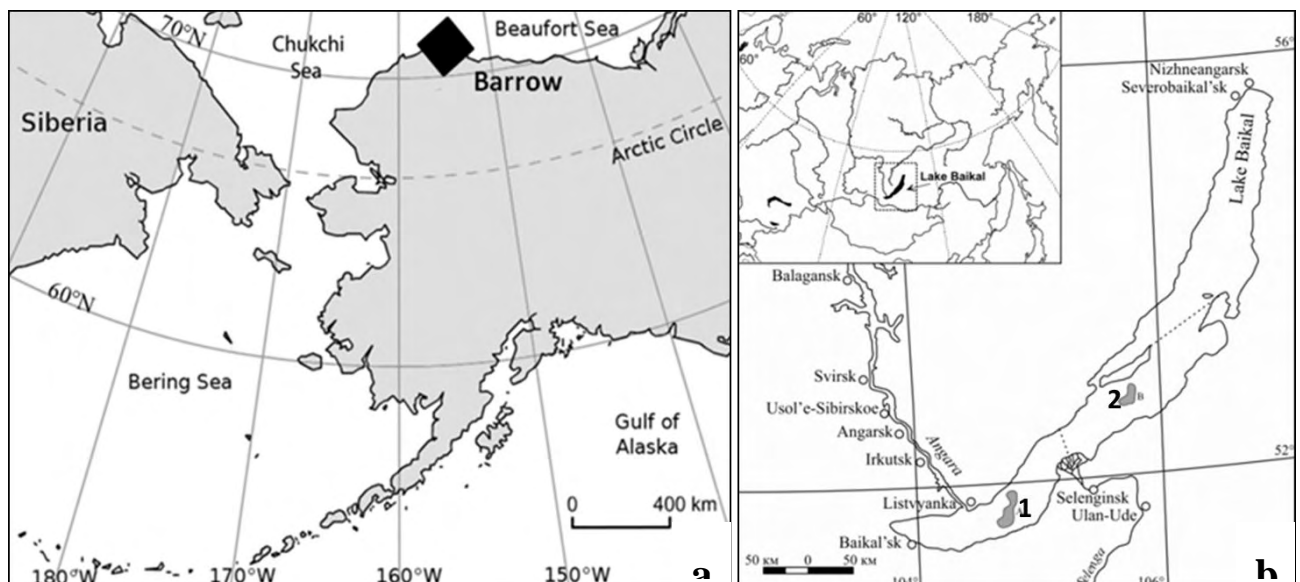


Figure S5: Localisation of the sampling sites for (a) belugas whales from Chukchi Sea and (b) seals from Lake Baikal (P-8, P-14, P-15, P-17 (sampling site 1) and P-10, P-12, P-16 (sampling site 2)).

Chapitre 7.

Application d'une méthode d'extraction sélective pour l'analyse isotopique spécifique du méthylmercure (MeHg-CSIA) dans les matériaux biologiques

Chapitre 7. Article publié dans *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* : Application d'une méthode d'extraction sélective pour l'analyse isotopique spécifique du méthylmercure (MeHg-CSIA) dans les matériaux biologiques

Résumé

Le monométhylmercure (MMHg) est un composé organométallique clé du Hg et une puissante neurotoxine qui s'accumule le long de la chaîne alimentaire. L'analyse de la spéciation du Hg dans les échantillons environnementaux est essentielle pour comprendre les sources, les dynamiques et l'impact du MMHg dans les écosystèmes. En parallèle, l'analyse des isotopes du Hg est un nouvel outil émergent pour essayer de répondre aux questions restant en suspens sur le cycle du Hg. Ces analyses ont jusqu'à présent uniquement porté sur la fraction totale du Hg. L'analyse spécifique des isotopes du Hg (Hg-CSIA) est une nouvelle approche pour comprendre le fractionnement isotopique du Hg au niveau moléculaire.

Les premières mesures de Hg-CSIA ont été effectuées récemment par le groupe de recherche de Vladimir Epov du LCABIE de Pau (Epov et al. (2008)). La séparation du MMHg et iHg se fait *en ligne* par chromatographie gazeuse. Les deux composés sont ensuite détectés par MC-ICPMS. Cette méthode pionnière utilisée dans le Chapitre 6 a ouvert la porte des analyses Hg-CSIA mais présente quelques limites ; (i) la première concerne la précision des mesures située autour de 0.3-0.5‰ (2SD, $\delta^{202}\text{Hg}$, $\Delta^{199}\text{Hg}$), (ii) la seconde est liée à la mise en place d'un couplage GC-MC-ICPMS complexe et délicate pour la plupart des laboratoires. Ainsi, nous proposons dans

Ainsi, nous avons développé dans cette étude une méthode robuste, précise et reproductible d'extraction du MMHg d'échantillons biologiques pour sa quantification ultérieure par AFS ou ID-GC-ICPMS et la détermination de sa signature isotopique par CV-MC-ICPMS. Brièvement, la méthode consiste en une première extraction du MMHg en phase organique suivie d'une extraction inverse en phase aqueuse permettant sa purification. Elle a été validée avec l'utilisation d'une solution standard de MMHg et de sept matériaux de références certifiés avec une large gamme de Hg total et de MMHg. Dans la solution finale extraite, le taux de purification du MMHg atteint 97% et des concentrations précises de MMHg ont été obtenus pour les différents matériaux (rendements >91%).

Chapitre 7. Application d'une méthode d'extraction sélective pour l'analyse isotopique spécifique du méthylmercure (MeHg-CSIA) dans les matériaux biologiques

Permettant une mesure à haute précision ($2SD \approx 0,1\%$) de la signature isotopique du MMHg par CV-MC-ICPMS, nous montrons une amélioration significative de la précision d'un facteur quatre pour cette méthode comparée aux mesures par GC-MC-ICPMS. Outre ce gain en précision, cette méthode est accessible pour nombre de laboratoire et devrait permettre le développement d'analyse de Hg-CSIA. Des valeurs de références pour la composition isotopique de HgT et MMHg sont données pour les matériaux de références suivants : NRCC-TORT-2, NRCC-DOLT-4, IRMM-ERMCE464, IRMM-BCR-463, IRMM-BCR-414, NIST-SRM-1947 et NIST-QC03LH03.

Cette étude a été acceptée et publiée le 9 août 2013 dans la revue « Journal of Analytical Atomic Spectrometry - RSC Publishing » après révisions mineures.

Application of a selective extraction method for methylmercury compound specific stable isotope analysis (MeHg-CSIA) in biological materials†

Cite this: DOI: 10.1039/c3ja50185j

Jeremy Masbou,* David Point and Jeroen E. Sonke

Methylmercury (MeHg) is a key organometallic compound of Hg and a potent neurotoxin that bioaccumulates along food webs. Hg speciation analysis of environmental samples is essential for understanding the sources, dynamics and impact of MeHg in ecosystems. Hg stable isotope analysis is a new tool to try and answer outstanding questions on Hg cycling, but has thus far been applied essentially to total Hg fractions in biota. Hg compound specific stable isotope analysis is a new approach to understand the isotopic fraction of Hg at the molecular level. In this study, we developed a robust, accurate and precise selective extraction method for MeHg in biological samples for subsequent quantification by AFS or ID-GC-ICPMS and determination of the isotopic composition by CV-MC-ICPMS. The method consists of an optimized two-step extraction/back-extraction technique validated using a MeHg standard solution and seven certified reference materials with a large range of total Hg and MeHg values. In the final extract solution, MeHg purification yields were higher than 97%, and accurate MeHg concentrations were obtained for the different certified materials. High precision MeHg stable isotope analysis (2SD \approx 0.1‰) by CV-MC-ICPMS showed a four-fold improvement in precision for this method relative to previous on-line GC-MC-ICPMS measurements. Reference values for total Hg and MeHg compound specific stable isotope values are given for NRCC-TORT-2, NRCC-DOLT-4, IRMM-ERM-CE464, IRMM-BCR-463, IRMM-BCR-414, NIST-SRM-1947 and NIST-QC03LH03 reference materials.

Received 30th May 2013
Accepted 9th August 2013
DOI: 10.1039/c3ja50185j
www.rsc.org/jaas

Introduction

Hg toxicity in the environment is highly dependent on its chemical form. Organometallic compounds such as methylmercury (MeHg) are known to be potent neurotoxins,¹ and to bioaccumulate along aquatic food chains.² The origin of MeHg and its production in aquatic systems are complex processes. MeHg production is controlled by the activity of sulphate reducing bacteria,^{3–5} while MeHg breakdown is dominated by solar radiation^{6,7} and bacterial activity.⁸ It is supposed that the net MeHg production may be rapidly incorporated into unicellular organisms or phytoplankton.⁹ Retention and transfer of MeHg to subsequent trophic levels have been shown to be significantly higher for MeHg relative to inorganic Hg (iHg) due to a preferential affinity of MeHg for specific proteins.^{10–12} MeHg therefore biomagnifies and bioaccumulates at each trophic level, leading to high concentrations in organisms at the top of the trophic chain.^{13,14} Several studies also document a significant variability in Hg speciation along the trophic chain, with

an overall increase in the MeHg to total Hg (HgT) concentration ratio from baseline organisms to top predators. Hg speciation may also differ among tissues and organs in higher organisms, especially aquatic mammals.^{15,16} The *in vivo* MeHg demethylation mechanism has been suggested to explain lower MeHg/HgT concentration ratios in liver, kidney or brain samples.^{17,18} Thus, accurate Hg speciation measurements in biota are essential in order to understand the mechanisms behind formation, degradation and accumulation of MeHg.

Chromatographic techniques such as gas chromatography (GC) are widely used for the identification and separation of chemical Hg compounds.^{19–22} GC generates transient signals subsequently detected by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS), atomic fluorescence spectrometry (AFS), or atomic absorption spectroscopy (AAS).²³ More recently, the analysis of the stable isotopic composition of Hg by cold vapor multi-collector inductively coupled plasma mass spectrometry (CV-MC-ICPMS) in biota provides a new angle on tracking Hg sources and dynamics in aquatic food chains.^{24–29} These studies reveal both Hg mass dependent isotope fractionation (MDF) and mass independent isotope fractionation (MIF), generally assessed by the $\delta^{202}\text{Hg}$ and $\Delta^{199}\text{Hg}$ isotope signatures respectively. Mercury MDF originates from various biotic/abiotic reactions leading to large $\delta^{202}\text{Hg}$ variations from -2.33‰ to 5.22‰ observed in fish tissues.^{28,30} On the contrary, processes

Observatoire Midi-Pyrénées, Laboratoire Géosciences Environnement Toulouse, CNRS/IRD/Université Paul Sabatier Toulouse 3, 14 avenue Edouard Belin, 31400 Toulouse, France. E-mail: jeremy.masbou@get.obs-mip.fr; Tel: +33 (0) 5 61 33 26 07
† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c3ja50185j

inducing Hg MIF are less diverse. Photochemical breakdown of aqueous MeHg and iHg complexes with organic matter has been suggested as the major process at the origin of positive $\Delta^{199}\text{Hg}$ observed in aquatic biota.^{30,31} Until now, most measurements of $\delta^{202}\text{Hg}$ and $\Delta^{199}\text{Hg}$ in environmental samples and in biota in particular have been performed on HgT. The stable isotopic composition of HgT represents the weighted average isotopic composition of the individual iHg and MeHg compounds. Quantifying $\delta^{202}\text{Hg}$ and $\Delta^{199}\text{Hg}$ of individual Hg compounds opens up the possibility to explore Hg isotope biogeochemistry at the molecular level. Epov and coworkers pioneered this field by coupling a gas chromatograph to MC-ICPMS to determine $\delta^{202}\text{Hg}$ and $\Delta^{199}\text{Hg}$ of iHg and MeHg using a transient signal approach.³² These early transient signal measurements were performed on derivatized Hg compounds and were characterized by trade-offs in measurement precision ($\delta^{202}\text{Hg}_{\text{MeHg}} > 0.3\text{‰}$), relative to steady state CV-MC-ICPMS determinations ($\approx 0.1\text{‰}$). Furthermore, Yang and coworkers suggested a possible Hg isotopic fractionation bias of derivatized Hg compounds in the case of a non-quantitative (100%) derivatization reaction.³³ Further work is thus required in the area of Hg compound stable isotope analysis (Hg-CSIA) with the development of alternative and independent methods to help determine the isotopic composition of Hg species in existing reference materials.

In this study, we applied a physico-chemical extraction and separation technique for MeHg in biological samples. Adapted from Uthe *et al.*,³⁴ this offline technique offers the advantage of allowing the quantification of MeHg in the final purified fraction using simple and cost effective techniques such as cold vapor-AFS (CV-AFS). The same MeHg fraction could also be characterized for its Hg stable isotopic composition by steady state CV-MC-ICPMS, without the need for GC separation and complex GC-MC-ICPMS setup, and offering a significant improvement in terms of measurement precision.

Materials and methods

Reagents, MeHg standard, and reference materials

Millipore 18.6 M Ω cm⁻¹ ultrapure water, bidistilled nitric (HNO₃, 15 mol l⁻¹) and hydrochloric (HCl, 10 mol l⁻¹) acids were used for preparation of all solutions throughout this study. iHg SRM 3133 solution (9.95 mg g⁻¹ \pm 0.05 mg g⁻¹, 95% confidence interval, NIST, USA), enriched ¹⁹⁹Hg (91.7% abundance, ISC-Science®, Spain) and Me²⁰¹Hg (96.5% abundance, ISC-Science®, Spain) certified solutions were used for external/internal calibration. Sodium bromide (NaBr, Ultra grade 99.5%), anhydrous cupric sulphate (CuSO₄, reagent grade 99%+), sodium thiosulfate (Na₂S₂O₃, reagent grade 98%), tetramethylammonium hydroxide solution (TMAH 25% in water, electronic grade 99.9999%), stannous chloride (SnCl₂, reagent grade 98%), sodium acetate (CH₃COONa, ACS grade 99%+), methanol (CH₃OH, anhydrous 99.8%), toluene (anhydrous 99.8%) and sulphuric acid (H₂SO₄, ACS grade 95–98%) were purchased from Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Ultra grade glacial acetic acid (CH₃COOH, 99%) was purchased from Avantor™ (The Netherlands). Sodium tetra-*n*-propylborate

Table 1 Matrix and Hg composition of certified reference materials (CRMs) used in this study

Provider	Standard reference material	Matrix	Preservation conditions	Particular treatment performed during CRM fabrication	[Hg] ^{certified} \pm uncertainty (ng g ⁻¹)	[MeHg] ^{certified} \pm uncertainty (ng g ⁻¹)	[MeHg]/[Hg] ^{certified} (%)
National Research Council Canada (NRCC)	DOLT-4	Deerfish liver	Freeze dried	Defatted material	2580 \pm 220	1330 \pm 120	52
	TORT-2	Lobster hepatopancreas	Freeze dried	Defatted material	270 \pm 60	152 \pm 13	56
Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM)	BCR-463	Tuna fish	Freeze dried	Raw material	2850 \pm 160	2828 \pm 160	99
	ERM-CR464	Tuna fish	Freeze dried	Raw material	5240 \pm 100	5117 \pm 170	98
National Institute of Standards and Technology (NIST)	BCR-414	Plankton	Freeze dried	Raw material	276 \pm 18	208 \pm 8 ^a	75
	SRM-1947	Trout tissue	Fresh frozen	Raw material	254 \pm 5	233 \pm 10	92
	NIST QC03LH03	Pygmy sperm whale liver	Fresh frozen	Raw material	3560 ^b \pm 670	990 \pm 23 ^c	28

^a [MeHg] not certified, data from ref. 42. ^b [MeHg] not certified, indicative value measured at the GET laboratory by ID-GC-ICPMS. ^c [HgT] not certified, data from ref. 43.

(98%, packed under argon, Merseburger Spezialchemikalien®, Germany) was prepared daily and stored at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. All labware used in this study was soaked twice in 10% HNO_3 for one day at $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ before rinsing with water and drying under a laminar flow hood.

MeHg standard solution preparation and calibration

A standard MeHg stock solution was prepared from methylmercury chloride salt (MeHgCl , 96%) purchased from Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Dissolution was made in a 10% (v/v) methanol/water solution. A secondary $13.8\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ diluted standard solution of the primary stock solution was prepared in 2% w/w bi-distilled HNO_3 and used in this work.

Biological certified reference materials (CRMs)

Seven biological CRMs characterized by different proportions of MeHg and iHg, manufacturing and original preparation processes (freeze dried vs. fresh frozen, defatted vs. non defatted) and representative of different tissue matrices (fish muscle, fish liver, whale liver, plankton) were used to investigate the robustness, accuracy and precision of the method. Details of the different certified biological materials used in this work are summarized in Table 1 and in the ESI section.†

MeHg selective extraction method

The MeHg selective extraction method (SEM) used in this work was adapted from Uthe *et al.*³⁴ An overview of the protocol is detailed in Fig. 1a. Analytical grade reagents and ultrapure Milli-Q 18 M Ω water were used for the method development and testing. Between 0.25 and 1 g of sample was weighed in 50 ml centrifuge tubes (Falcon™, VWR®). Then 5 ml of acidic sodium bromide (30% w/w NaBr in 4 mol l⁻¹ H_2SO_4), 10 ml of aqueous cupric sulfate (2.5% w/w CuSO_4) and 10 ml of toluene were added in the following order into the same centrifuge tube. The extraction step consisted of subjecting the centrifuge tube to lengthwise agitation at 420 rpm for 1 hour on a horizontal shaking table. During the extraction step, the combined action of reagents extracts MeHg from the tissue matrix and converts it into MeHgBr, which is readily transferred into the organic toluene phase. About 3 to 6 ml of the toluene phase was then aliquoted and transferred into a 15 ml centrifuge tube (Falcon™, VWR®) containing 4 ml of an aqueous sodium thiosulfate solution (0.005 mol l⁻¹). The centrifuge tubes were vortexed for 1 minute, allowing MeHgBr present in the toluene phase to be converted into a stable MeHg-thiosulfate complex, back-extracted into the aqueous phase. An aliquot of the MeHg-thiosulfate aqueous phase was collected in a 5 ml tube and kept at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis.

MeHg recovery and purity

The strategy used to investigate the efficiency of the SEM is described in Fig. 1b. The method was first tested using a pure MeHg standard solution, before investigating robustness and performance tests against several contrasted biological CRMs. MeHg recovery at the end of the two separation and purification

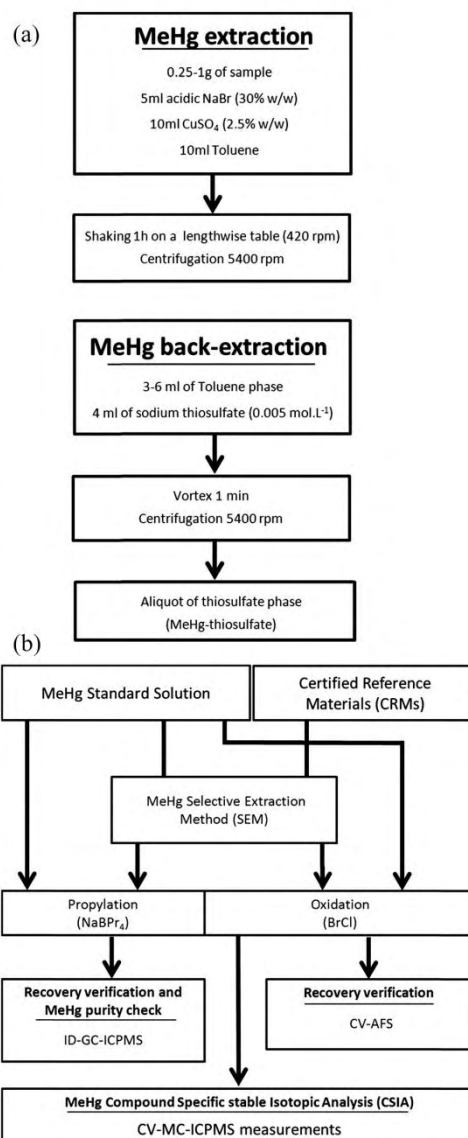


Fig. 1 (a) Overview of the MeHg selective extraction method (SEM). (b) Validation protocol for the MeHg SEM for MeHg quantification, and MeHg-CSIA measurements.

steps was investigated using two independent methods: isotope dilution-gas chromatography-ICPMS (ID-GC-ICPMS) and CV-AFS. ID-GC-ICPMS also allowed the determination of the MeHg purity level relative to iHg impurities to check for the efficiency

of the chemical separation process, with also verifying for the absence of other organic Hg compounds relative to MeHg in the final extract fractions. Finally, CV-MC-ICPMS measurements were performed for MeHg-CSIA.

ID-GC-ICPMS

Sample aliquots of the final purified MeHg-thiosulfate fractions were diluted at least ten times in aqueous HCl (0.05% v/v) to minimize the effect of competing sulphur groups in solution during the derivatization step.³⁵ About 1 ml of this diluted solution was then mixed with isotopically enriched Hg species ¹⁹⁹iHg (ISC-Science®, Spain) and Me²⁰¹Hg (ISC-Science®, Spain) in a 5 ml acetate buffer solution (0.1 mol l⁻¹, pH 3.9) and kept for 30 min in the dark. Daily prepared sodium propyl-borate (NaPr₄B 2% (w/w), 300 μl, Merseburger Spezialchemikalien®, Germany) and 1 ml of hexane were then added before hand-shaking the solution for 5 min. The final derivatized hexane extracts contained 5 to 10 ng g⁻¹ of MeHg and were kept at -18 °C until analysis by GC (Thermo Scientific® Trace Ultra)-HR-ICPMS (Thermo Scientific® Element-XR) analysis (Table S1, ESI†).¹⁹

CV-AFS

MeHg concentrations in the final purified MeHg-thiosulfate fractions were also determined by CV-AFS following the EPA 1631 protocol³⁶ using a custom made gold amalgamation system connected to a Brooks Rand (Seattle, USA) AFS detector. Sample aliquots of the final purified MeHg-thiosulfate fractions were diluted at least five times in 0.5% HCl (v/v). Oxidation of MeHg into a SnCl₂ reducible iHg form was realized by adding 0.1 to 0.3 ml of acidic BrCl (0.2 mol l⁻¹ in 10 mol l⁻¹ HCl) solution. Solutions containing between 0.5 and 5% (v/v) final concentrations of BrCl were left at 4 °C for 12 hours for complete MeHg degradation. Approximately one hour before analysis, the excess of BrCl in solution was neutralized using 0.05 to 0.15 ml of aqueous hydrochloride hydroxylamine solution (NH₂OH-HCl, 20.8 mol l⁻¹). About 250 μL of Hg free (Ar pre-purged) SnCl₂ (20% w/v in 1 mol l⁻¹ HCl) was added to 0.1–0.2 ml of sample and analyzed using previously published CV-AFS conditions.³⁶ MeHg CV-AFS measurements (10–100 pg Hg range) were obtained by external calibration quantification using NIST 3133 iHg standard as the primary calibrant.

MeHg-CSIA by CV-MC-ICPMS

The purified MeHg-thiosulfate fractions were diluted to final Hg concentrations of 2 to 5 ng g⁻¹ in a mixture of HNO₃ and HCl acids (2.25 mol l⁻¹ HNO₃, 0.5 mol l⁻¹ HCl) before analysis by CV-MC-ICPMS. Between 0.1 and 0.3 ml of acidic BrCl (0.2 mol l⁻¹ in 10 mol l⁻¹ HCl) solution was added at least 12 hours before analysis to convert MeHg into iHg. All seven Hg stable isotopes (196, 0.15%, 198, 9.97%, 199, 16.84%, 200, 23.10%, 201, 13.18%, 202, 29.86% and 204, 6.87%) were measured by CV-MC-ICPMS (Thermo Finnigan® Neptune) at the Midi-Pyrenees Observatory laboratory (Toulouse, France) using previously published analytical and operational conditions.³⁷ Isotopic ratios ²⁰²Hg/¹⁹⁸Hg, ²⁰¹Hg/¹⁹⁸Hg, ²⁰⁰Hg/¹⁹⁸Hg and ¹⁹⁹Hg/¹⁹⁸Hg were monitored and deltas were expressed relative

to NIST SRM 3133 following Blum and Bergquist recommendation guidelines.³⁸ Briefly, δ values are calculated as follows:

$$\delta^{xxx}\text{Hg} (\text{‰}) = \left[\left(\frac{\left(\frac{^{xxx}\text{Hg}}{^{198}\text{Hg}} \right)_{\text{sample}}}{\left(\frac{^{xxx}\text{Hg}}{^{198}\text{Hg}} \right)_{\text{NIST 3133}}} \right) - 1 \right] \times 1000$$

where xxx represents the mass of each mercury isotope.

Mass independent fractionation (MIF) is expressed by the Δ notation:

$$\Delta^{199}\text{Hg}(\text{‰}) = \delta^{199}\text{Hg} - (\delta^{202}\text{Hg} \times 0.252)$$

$$\Delta^{200}\text{Hg}(\text{‰}) = \delta^{200}\text{Hg} - (\delta^{202}\text{Hg} \times 0.502)$$

$$\Delta^{201}\text{Hg}(\text{‰}) = \delta^{201}\text{Hg} - (\delta^{202}\text{Hg} \times 0.752)$$

Analyzed solutions containing iHg concentrations between 2 and 5 ng g⁻¹ were matched by NIST 3133 bracketing standards within 10%. Each sample solution was analyzed in triplicate, and reported uncertainties represent 2SD of the replicate measurements. Secondary reference material UM-Almaden was prepared in the same way and analyzed every 8–10 samples for checking for long-term reproducibility and measurement accuracy. δ²⁰²Hg values of -0.52 ± 0.12‰ and Δ¹⁹⁹Hg = -0.04 ± 0.09‰ (mean ± 2SD, n = 20) were obtained for this material. These values are consistent with previously published values³⁰ (Table S2, ESI†). Following Blum and Bergquist³⁸ recommendations, uncertainties in isotopic measurements used in the text and for interpretations/calculations correspond to the 2SD of sample replicates, unless these are lower than the 2SD for UM-Almaden, in which case the latter was used.

Total Hg isotope analysis by CV-MC-ICPMS

Mercury stable isotopic measurements on total Hg (Hg_T) fractions by CV-MC-ICPMS were obtained using the same operating conditions as indicated above. About 0.25 g of fresh/freeze-dried biological material was first completely digested with 5 ml of bi-distilled HNO₃ (15 mol l⁻¹) in a 50 ml pyrex microwave digestion vessel, closed by Teflon caps. Sample digestion was performed with a CEM® Discover SP-D microwave (180 °C, 150 PSI, 10 min). Total Hg acidic extracts were diluted to 2–5 ng g⁻¹ in a mixture of HNO₃ and HCl acids (2.25 mol l⁻¹ HNO₃, 0.5 mol l⁻¹ HCl) for analysis by CV-MC-ICPMS. Between 0.1 and 0.3 ml of acidic BrCl (0.2 mol l⁻¹ in 10 mol l⁻¹ HCl) solution was added to both solutions at least 12 hours before analysis.

iHg-CSIA calculations

Knowing the stable isotopic composition of Hg_T and MeHg, the iHg compound stable isotopic composition could be estimated by isotopic mass balance difference:

$$\delta^{xxx}\text{Hg}_{\text{HgT}} = \delta^{xxx}\text{Hg}_{\text{iHg}} \times \frac{[\text{iHg}]}{[\text{HgT}]} + \delta^{xxx}\text{Hg}_{\text{MeHg}} \times \frac{[\text{MeHg}]}{[\text{HgT}]}$$

where xxx represents the mass of each mercury isotope. This equation and approach assumes that iHg and MeHg are the two dominant Hg compounds in the samples.

Results and discussion

SEM validation

The efficiency of the SEM was first investigated using a standard MeHg solution, before testing different CRMs. Two certified biological reference materials (NRCC TORT-2, DOLT-4) were extensively investigated to provide precision and accuracy estimates for the SEM, with the five others being measured for documenting the method's robustness across a wider range of materials. The secondary $13.8 \mu\text{g g}^{-1}$ MeHg standard solution was first calibrated against ISC-Science® Me²⁰¹Hg and ¹⁹⁹iHg standard by ID-GC-ICPMS and NIST SRM 3133 by CV-AFS. This cross calibration showed similar values (Student's *t*-test, *p* = 0.71 between ID-GC-ICPMS and CV-AFS measurements), consistent with the theoretical concentration of the solution (Table 2 and Table S3, ESI†). Inorganic Hg impurity levels for the MeHg standard solution were found to be lower than 2.4% (measured by ID-GC-ICPMS). This standard solution was then processed according to the operating procedure detailed in

Fig. 1b. Concentration results obtained after applying the SEM on the final MeHg–thiosulfate fraction were recalculated from the dilution factors for direct comparison to the secondary MeHg standard stock solution to estimate the recovery yield of the method. Results are illustrated in Table 2. MeHg concentration results and their uncertainties obtained by ID-GC-ICPMS and CV-AFS on the final separated and purified MeHg–thiosulfate fraction were consistent regardless of the method considered. Results showed recovery yields of $99 \pm 2\%$ and $105 \pm 6\%$ relative to the initial MeHg solution before SEM as determined by ID-GC-ICPMS and CV-AFS. These results confirm the quantitative transfer of MeHg from the initial solution to the final MeHg–thiosulfate fraction, with the absence of degradation into iHg.

The same approach was applied to TORT-2 and DOLT-4 materials using 250 mg of material. Results for the two biological reference materials are presented in Table 3. Results show quantitative MeHg extraction efficiencies, with MeHg measurements obtained by both ID-GC-ICPMS and CV-AFS

Table 2 Application of the MeHg SEM on a MeHg standard solution. [MeHg] corresponds to re-calculated concentrations of the initial MeHg standard stock solution applying dilution factors to ID-GC-ICPMS and CV-AFS measurements. Direct comparison of re-calculated MeHg standard stock solution concentrations (before and after SEM) allows estimating the recovery yield of the method

Analytical method	Calibration of MeHg standard solution (before MeHg SEM)		MeHg standard solution recovery check (after MeHg SEM)			
	<i>n</i>	[MeHg] ± SD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	<i>n</i>	[MeHg] ± SD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	[MeHg] purity yield ± SD (%)	Recovery ± SD (%)
Theoretical		13.84				
ID-GC-ICPMS	3	14.03 ± 0.37	6	13.82 ± 0.31	97.5 ± 0.1	99 ± 2
CV-AFS	3	13.89 ± 0.63	6	14.63 ± 0.84	—	105 ± 6

Table 3 MeHg concentrations and recoveries measured in the final extract fraction obtained after applying the SEM on selected CRMs

Standard reference material	Analytical method	Mass of material (g)	<i>n</i>	[MeHg] _{measured} ± SD (ng g^{-1})	[MeHg] purity yield ± SD (%)	Recovery ^a ± SD (%)
DOLT-4	ID-GC-ICPMS	0.25	9	1342 ± 96	98.2 ± 1.2	101 ± 7
		1	9	1294 ± 44	97.5 ± 0.8	97 ± 3
	CV-AFS	0.25	9	1401 ± 126		105 ± 10
TORT-2	ID-GC-ICPMS	1	9	1439 ± 158		108 ± 12
		0.25	6	164 ± 2	97.9 ± 0.2	108 ± 1
	CV-AFS	1	9	152 ± 7	97.8 ± 0.6	100 ± 5
BCR-463	ID-GC-ICPMS	0.25	6	162 ± 1		106 ± 1
		1	9	150 ± 13		99 ± 8
	CV-AFS	0.25	0	—		—
ERM-CE464	ID-GC-ICPMS	0.25	3	2771 ± 208		98 ± 7
		1	9	5012 ± 156	97.5 ± 0.3	98 ± 3
	CV-AFS	0.25	9	5455 ± 382		107 ± 8
SRM-1947	ID-GC-ICPMS	0.75	3	229 ± 5	98.4 ± 0.1	98 ± 2
		1	3	257 ± 23		110 ± 10
	CV-AFS	0.75	3	190 ± 3	98.4 ± 0.5	91 ± 2
BCR-414	ID-GC-ICPMS	1	3	210 ± 19		101 ± 9
		0.75	3	995 ± 19	97.8 ± 0.7	104 ± 2
	CV-AFS	1	3	1023 ± 97		103 ± 10

^a Calculated relative the certified values reported on the certificate of analysis, or from other indicative values (see Table 1).

being consistent with the certified values. This indicates a complete and quantitative extraction of MeHg from the TORT-2 and DOLT-4 tissue matrix into the final MeHg-thiosulfate. The presence of iHg impurities in the final MeHg-thiosulfate solution was also determined by ID-GC-ICPMS, and results are illustrated in Table 3. Results show that for the materials investigated, iHg impurities accounted for less than 2.5%, indicating that MeHg was enriched to $\geq 97.5\%$ in the final MeHg-thiosulfate solution. Further, no other organic Hg compounds relative to MeHg were observed on the GC-ICP-MS chromatograms, evidencing the MeHg compound specific characteristics for this method. The negligible impurity level of iHg relative to MeHg also demonstrates the efficiency of the separation process considering the initial iHg fraction level of 44% and 48% for TORT-2 and DOLT-4 materials, respectively.

The method's robustness to a higher charge of sample matrix was investigated by increasing the sample mass from 0.25 g to 1 g of biological material. MeHg concentration results and their associated uncertainties using 1 g of sample mass showed consistent results with those obtained with a lower mass of material, using either CV-AFS or ID-GC-ICPMS approaches for MeHg quantification (Table 3). Inorganic Hg impurities were also found to be lower than 2.5% using 1 g of sample material, similar to the results obtained with 0.25 g of material. This confirms the ability of the method to efficiently process high sample masses of biological material, up to 1 g, with keeping the extraction quantitative and maintaining MeHg purity yields $>97\%$ relative to trace iHg impurities ($<3\%$).

Finally, the same methodology was applied to other complementary biological materials to document the method's robustness over a wide range of tissue material. Freeze-dried fish tissues (BCR-463, ERM-CE464) and fresh frozen fish tissues (SRM-1947) with certified MeHg contents, and both freeze dried plankton (BCR-414) and fresh frozen whale liver tissues (NIST QC03LH03) with MeHg information values were also investigated (see Table 2 for details). Results for MeHg in raw "non-defatted" certified materials BCR-463, ERM-CE464 and SRM-1947 suggested recovery values with their uncertainty in good agreement with the certified contents, while keeping iHg impurities lower than 2.5% in the final MeHg thiosulfate fraction. MeHg concentration determinations and their associated uncertainties obtained by either CV-AFS or ID-GC-ICPMS led to similar results for the three different CRMs investigated. Analysis of plankton material (BCR-414) and whale liver material (NIST QC03LH03) led to MeHg concentrations in good agreement with the indicative values, although those are not certified. Additional and complementary direct MeHg measurements by ID-GC-ICPMS are needed for BCR-414 to help establish a more precise reference value, using at least a second independent technique employing isotope dilution.

The good agreement between the MeHg concentration results obtained by either CV-AFS or ID-GC-ICPMS on the purified MeHg-thiosulfate final extracts and the certified values from several biological reference materials demonstrates the high robustness of the SEM. Results show its high efficiency for handling up to 1 g of different types of tissues, matrices and in the context of contrasted MeHg levels among reference

Table 4 Hg isotopic measurements on HgT and MeHg fractions of the MeHg standard solution and CRMs

Solution/certified reference material	n	[MeHg]/[HgT] (%)	Hg fraction	$\delta^{199}\text{Hg}$ (‰)	2SD (‰)	$\delta^{200}\text{Hg}$ (‰)	2SD (‰)	$\delta^{201}\text{Hg}$ (‰)	2SD (‰)	$\delta^{202}\text{Hg}$ (‰)	2SD (‰)	$\Delta^{199}\text{Hg}$ (‰)	2SD (‰)	$\Delta^{200}\text{Hg}$ (‰)	2SD (‰)	$\Delta^{201}\text{Hg}$ (‰)	2SD (‰)	$\Delta^{202}\text{Hg}$ (‰)	2SD (‰)
MeHg standard solution before SEM	3	98	HgT	-0.20	0.06	-0.41	0.04	-0.66	0.05	-0.81	0.02	0.01	0.06	0.00	0.03	-0.05	0.04		
MeHg standard solution after SEM	9		MeHg	-0.17	0.08	-0.39	0.08	-0.63	0.09	-0.79	0.08	0.03	0.06	0.01	0.05	-0.03	0.05		
DOLT-4	9	52	HgT	0.89	0.09	-0.07	0.07	0.66	0.11	-0.20	0.13	0.94	0.09	0.03	0.07	0.81	0.09		
	9		MeHg	1.20	0.04	0.06	0.05	0.98	0.05	0.05	0.05	1.19	0.03	0.04	0.03	0.94	0.03		
TORT-2	3	56	HgT	0.73	0.11	0.03	0.21	0.42	0.14	-0.33	0.16	0.82	0.07	0.20	0.18	0.67	0.12		
	9		MeHg	1.18	0.13	0.31	0.11	1.24	0.18	0.54	0.15	1.04	0.12	0.04	0.06	0.83	0.12		
BCR-463	6	99	HgT	1.95	0.09	0.40	0.15	2.01	0.13	0.61	0.11	1.80	0.10	0.09	0.09	1.55	0.04		
	6		MeHg	1.97	0.07	0.31	0.11	1.95	0.11	0.58	0.11	1.82	0.06	0.01	0.09	1.51	0.09		
ERM-CE464	6	98	HgT	2.48	0.08	0.50	0.14	2.47	0.14	0.73	0.14	2.29	0.09	0.13	0.07	1.92	0.04		
	6		MeHg	2.50	0.13	0.39	0.09	2.35	0.17	0.62	0.13	2.34	0.11	0.08	0.05	1.88	0.07		
SRM-1947	6	92	HgT	5.58	0.09	0.85	0.11	5.15	0.10	1.29	0.12	5.26	0.07	0.20	0.10	4.18	0.07		
	6		MeHg	5.57	0.06	0.63	0.10	4.95	0.03	1.11	0.07	5.29	0.06	0.08	0.08	4.12	0.04		
BCR-414	3	75	HgT	0.71	0.10	0.15	0.12	0.55	0.10	-0.07	0.11	0.73	0.11	0.13	0.08	0.61	0.14		
	3		MeHg	0.84	0.05	0.08	0.10	0.65	0.03	0.06	0.02	0.82	0.05	0.05	0.09	0.61	0.02		
NIST QC03LH03	20	28	HgT	0.97	0.10	-0.33	0.07	0.35	0.12	-0.78	0.14	1.16	0.10	0.06	0.04	0.94	0.10		
	6		MeHg	1.38	0.10	0.23	0.11	1.32	0.10	0.38	0.06	1.29	0.09	0.04	0.09	1.03	0.09		

materials. The quantitative extraction of MeHg from these seven reference biological materials and the negligible presence of iHg impurities (<2.5%) in the final MeHg–thiosulfate fraction make this technique suitable for MeHg-CSIA in biological materials.

Application to MeHg-CSIA by CV-MC-ICPMS

Potential Hg isotope fractionation bias induced by the SEM has been investigated first by comparing the Hg stable isotopic signatures of the MeHg standard solution to the final extracted and purified MeHg–thiosulfate solution. Both measurements were performed by CV-MC-ICPMS and results are illustrated in Table 4. Mercury MDF ($\delta^{202}\text{Hg}$) and MIF ($\Delta^{199}\text{Hg}$) signatures of the MeHg standard solution ($\delta^{202}\text{Hg}_{\text{HgT}} = -0.81 \pm 0.12\text{‰}$; $\Delta^{199}\text{Hg}_{\text{HgT}} = 0.01 \pm 0.09\text{‰}$ (mean \pm 2SD, $n = 3$) respectively) were found to be not statistically different from the Hg MDF (Student's t -test, $p = 0.79$) and MIF (Student's t -test, $p = 0.87$) signatures measured on the MeHg–thiosulfate solution after SEM ($\delta^{202}\text{Hg}_{\text{MeHg}} = -0.79 \pm 0.12\text{‰}$ and $\Delta^{199}\text{Hg}_{\text{MeHg}} = 0.03 \pm 0.09\text{‰}$ (mean \pm 2SD, $n = 9$), respectively). This confirms the absence of isotopic fractionation (MDF and MIF) bias associated with the SEM. These measurements are consistent with the quantitative transfer of MeHg and the purity (MeHg > 97%) of the final MeHg–thiosulfate purified solution (see previous section).

Subsequently we investigated the ability of the SEM to handle sample tissue matrices without inducing significant Hg isotopic bias. Two biological reference materials presenting high proportions of MeHg relative to HgT (>98%), BCR-463 and ERM-CE464 respectively, were selected for analysis and their respective Hg MDF and Hg MIF signatures were first determined for the total Hg fraction (after complete digestion of the samples, see the Materials and methods section for details). The HgT isotope signatures were then compared to the MeHg MDF and MIF signatures obtained for the MeHg–thiosulfate final solutions after SEM for the same samples (Table 4). Mercury MDF and MIF signatures for the total HgT fractions were $\delta^{202}\text{Hg}_{\text{HgT}} = 0.61 \pm 0.12\text{‰}$ and $\delta^{202}\text{Hg}_{\text{HgT}} = 0.73 \pm 0.14\text{‰}$ for BCR-463 and ERM-CE464, respectively and $\Delta^{199}\text{Hg}_{\text{HgT}} = 1.80 \pm 0.10\text{‰}$ and $\Delta^{199}\text{Hg}_{\text{HgT}} = 2.29 \pm 0.09\text{‰}$, respectively (mean \pm 2SD, $n = 6$). In comparison, their respective MeHg-CSIA counterparts obtained for the final MeHg–thiosulfate fractions were

$\delta^{202}\text{Hg}_{\text{MeHg}} = 0.58 \pm 0.12\text{‰}$ and $\delta^{202}\text{Hg}_{\text{MeHg}} = 0.62 \pm 0.13\text{‰}$ for BCR-463 and ERM-CE464, and $\Delta^{199}\text{Hg}_{\text{MeHg}} = 1.82 \pm 0.09\text{‰}$ and $\Delta^{199}\text{Hg}_{\text{MeHg}} = 2.34 \pm 0.11\text{‰}$, respectively (mean \pm 2SD, $n = 6$). The insignificant differences between HgT and MeHg fractions for both MDF (Student's t -test, $p = 0.58$, $p = 0.10$ for BCR-463 and ERM-CE464 respectively) and MIF (Student's t -test, $p = 0.37$, $p = 0.78$ for BCR-463 and ERM-CE464 respectively) signatures confirmed the absence of isotopic bias by the SEM. Precision of MeHg-CSIA by CV-MC-ICPMS was found to be nearly identical to their HgT counterparts, suggesting that MeHg-CSIA could be performed at a similar precision level as classical HgT isotopic measurements ($\approx 0.1\text{‰}$).

Comparison between SEM-CV-MC-ICPMS and GC-MC-ICPMS techniques for MeHg CSIA

To complete the validation of the accuracy of the method, MeHg-CSIA values obtained by the SEM-CV-MC-ICPMS were compared to previously published MeHg-CSIA values^{32,39} obtained by GC-MC-IC-MS for ERM-CE464 tuna fish material. Comparison results are presented in Table 5. ERM-CE464 MeHg-CSIA of $\delta^{202}\text{Hg}_{\text{MeHg}} = 0.62 \pm 0.13\text{‰}$ and $\Delta^{199}\text{Hg}_{\text{MeHg}} = 2.34 \pm 0.11\text{‰}$ (mean \pm 2SD, $n = 6$) measured in this study are consistent with those observed earlier by GC-MC-ICPMS ($\delta^{202}\text{Hg}_{\text{MeHg}} = 0.65 \pm 0.30\text{‰}$ and $\Delta^{199}\text{Hg}_{\text{MeHg}} = 2.52 \pm 0.44\text{‰}$ (mean \pm 2SD, $n = 3$)³²). In terms of measurement precision, we found significantly lower 2SD for SEM-CV-MC-ICPMS replicates compared to GC-MC-ICPMS. Measurement precision for MeHg MDF and MIF signatures by the SEM-CV-MC-ICPMS method was found to be three to four-fold more precise compared to GC-MC-ICPMS determinations for real biological samples.

Hg speciation influence on MeHg-CSIA

The above presented results on CRMs with high MeHg proportions support the use of this method for biological materials with more variable larger MeHg/HgT ratios. In the SRM-1947 reference material (MeHg/HgT = 0.92), HgT fraction display $\delta^{202}\text{Hg}_{\text{HgT}} = 1.29 \pm 0.12\text{‰}$ and $\Delta^{199}\text{Hg}_{\text{HgT}} = 5.26 \pm 0.09\text{‰}$ values, similar to $\delta^{202}\text{Hg}_{\text{MeHg}} = 1.11 \pm 0.12\text{‰}$ and $\Delta^{199}\text{Hg}_{\text{MeHg}} = 5.29 \pm 0.09$ (mean \pm 2SD, $n = 6$) values observed in MeHg fraction. The slight difference observed with MDF is probably generated by the non-negligible 8% amount of iHg present in the material. With higher Hg speciation variability

Table 5 Comparison of method performance and measurement precision between SEM-CV-MC-ICPMS and GC-MC-ICPMS techniques for MeHg-CSIA on ERM-CE464 Tuna fish reference material

Analytical technique	n	$\delta^{202}\text{Hg}_{\text{MeHg}}$ (‰)	2SD (‰)	2SE (‰)	$\Delta^{199}\text{Hg}_{\text{MeHg}}$ (‰)	2SD (‰)	2SE (‰)	Reference
GC-MC-ICPMS (with no preconcentration of the final organic phase)	3	0.93	0.67	0.39	2.21	0.70	0.40	32
GC-MC-ICPMS (with preconcentration of the final organic phase)	3	0.65	0.30	0.17	2.52	0.44	0.25	32
GC-MC-ICPMS	?	0.55	0.24	?	2.41	0.15	?	39
SEM-CV-MC-ICPMS	6	0.62	0.13	0.06	2.34	0.11	0.04	This study

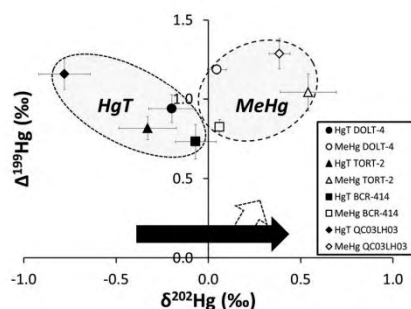


Fig. 2 Summary of HgT and MeHg isotopic signatures, $\delta^{202}\text{Hg}$ and $\Delta^{199}\text{Hg}$, in four biological CRMs with large differences between MeHg and HgT concentrations ($\text{MeHg}/\text{HgT} \leq 0.75$).

($\text{MeHg}/\text{HgT} < 0.75$), DOLT-4, TORT-2, BCR-414 and NIST QC03LH03 CRMs display significant isotopic differences between the HgT and MeHg fractions (Fig. 2). MeHg fractions in these CRMs are systematically enriched in the heavier isotopes ($\delta^{202}\text{Hg}_{\text{MeHg}} < \delta^{202}\text{Hg}_{\text{HgT}}$). This implies that the iHg fraction is depleted in the heavier isotopes compared to the MeHg fraction ($\delta^{202}\text{Hg}_{\text{iHg}} \ll \delta^{202}\text{Hg}_{\text{MeHg}}$). DOLT-4, TORT-2 and NIST QC03LH03 hepatic tissues have been suggested to host *in vivo* MeHg demethylation.¹⁷ Kritee *et al.* (2009) showed that microbial MeHg demethylation enriches residual MeHg in the heavier isotopes.⁴⁰ Our observation ($\delta^{202}\text{Hg}_{\text{iHg}} \ll \delta^{202}\text{Hg}_{\text{MeHg}}$) is in agreement with *in vivo* biotic demethylation as a driving factor.

In terms of Hg MIF anomalies, HgT and MeHg present very similar magnitudes for all materials (Fig. 2). However, individual variations in MIF signatures could be detected. Hg-CSIA in DOLT-4 and TORT-2 CRMs slightly varies with values of $\Delta^{199}\text{Hg}_{\text{HgT}} = 0.94 \pm 0.09\text{‰}$ to $\Delta^{199}\text{Hg}_{\text{MeHg}} = 1.19 \pm 0.09\text{‰}$ and $\Delta^{199}\text{Hg}_{\text{HgT}} = 0.82 \pm 0.09\text{‰}$ to $\Delta^{199}\text{Hg}_{\text{MeHg}} = 1.04 \pm 0.12\text{‰}$ respectively (mean \pm 2SD, $n = 9$). In parallel, iHg isotopic determination by mass balance calculations has been performed. Respecting the error propagation laws, it appears that, except for high iHg amounts (*i.e.* NIST QC03LH03), errors on calculated δ values are large. For example, $\delta^{202}\text{Hg}_{\text{iHg}} = -1.44 \pm 0.55\text{‰}$ and $\Delta^{199}\text{Hg}_{\text{iHg}} = 0.53 \pm 0.35\text{‰}$, and $\delta^{202}\text{Hg}_{\text{iHg}} = -0.45 \pm 0.38\text{‰}$ and $\Delta^{199}\text{Hg}_{\text{iHg}} = 0.68 \pm 0.27\text{‰}$ (mean \pm 2SD, $n = 9$) have been calculated for TORT-2 and DOLT-4 respectively. These high calculated uncertainties are similar to those obtained by GC-MC-ICPMS on MeHg fractions (Table 5) and represent a possible limit of the method. We suggest that iHg isotopic mass balance calculations are more useful for materials with major iHg fractions (>50%). NIST QC03LH03 whale liver with 29% of MeHg displays lower 2SD's of 0.24‰ and 0.18‰ for $\delta^{202}\text{Hg}_{\text{iHg}}$ and $\Delta^{199}\text{Hg}_{\text{iHg}}$ respectively.

Finally, we plotted $\Delta^{199}\text{Hg}$ against $\Delta^{201}\text{Hg}$ values for all biological CRMs (Fig. S1, ESI†), except SRM-1947 which displays a $\Delta^{199}\text{Hg}_{\text{HgT}} = 5.26 \pm 0.09\text{‰}$ (mean \pm 2SD) far from the others causing bias in the regression determination. Identical $\Delta^{199}\text{Hg}_{\text{HgT}}$ vs. $\Delta^{201}\text{Hg}_{\text{HgT}}$ and $\Delta^{199}\text{Hg}_{\text{MeHg}}$ vs. $\Delta^{201}\text{Hg}_{\text{MeHg}}$ slope values have been found (Fig. S1, ESI†), 1.18 ± 0.13 and $1.18 \pm$

0.14 (mean \pm 2SE, York regression⁴¹) respectively. These slopes are consistent with the magnetic isotope effect that operates during MeHg photo-degradation in aqueous environments, as observed in experimental studies.^{30,31}

Conclusions

Through the exploration of MeHg-CSIA of biological samples, several opportunities emerge for understanding biogeochemical Hg dynamics. Measurement of the Hg isotopic composition of picomolar levels of iHg and MeHg in surface waters has not been possible thus far. The high pre-concentration potential and matrix robustness of the SEM allow the investigation of Hg-CSIA of low trophic level organisms such as plankton. MeHg and iHg-CSIA in plankton may provide information both on the sources of both species to the base of aquatic food webs and also on the biogeochemical and photochemical dynamics of iHg and MeHg in the photic zone. On the other hand, Hg-CSIA of biological tissues of higher organisms may provide information on Hg metabolism. With high Hg speciation variability among tissues, total Hg isotopic measurements are not sufficient and molecular approaches appear to be essential.

Acknowledgements

This work is supported by research grants ANR-09-JCJC-0035-01 from the French Agence Nationale de La Recherche, ERC-2010-StG_20091028 from the European Research Council to JES, and Observatoire Midi Pyrénées (OMP) internal isotope funding to DP. JM is grateful to the "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche" for his Doctoral Fellowship (Ecole Doctorale ED SDU2E/UPS). L.-E. Heimbürger is thanked for technical assistance on CV-AFS measurements and E. de la Galvez is thanked for help during sample preparation.

References

- 1 A. L. Choi and P. Grandjean, *Environ. Chem.*, 2008, **5**, 112–120, DOI: 10.1071/EN08014.
- 2 R. P. Mason, J. R. Reinfelder and F. M. M. Morel, *Water, Air, Soil Pollut.*, 1995, **80**, 915–921, DOI: 10.1007/bf01189744.
- 3 G. C. Compeau and R. Bartha, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1985, **50**, 498–502.
- 4 M. Ranchou-Peyruse, M. Monperrus, R. Bridou, R. Duran, D. Amouroux, J. C. Salvado and R. Guyoneaud, *Geomicrobiol. J.*, 2009, **26**, 1–8, DOI: 10.1080/01490450802599227.
- 5 J. M. Benoit, C. C. Gilmour and R. P. Mason, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**, 51–58, DOI: 10.1128/aem.67.1.51-58.2001.
- 6 P. Seller, C. A. Kelly, J. W. M. Rudd and A. R. MacHutchon, *Nature*, 1996, **380**, 694–697.
- 7 I. Lehnher and V. L. St. Louis, *Environ. Sci. Technol.*, 2009, **43**, 5692–5698, DOI: 10.1021/es9002923.
- 8 M. Marvin-DiPasquale, J. Agee, C. McGowan, R. S. Oremland, M. Thomas, D. Krabbenhoft and C. C. Gilmour, *Environ. Sci. Technol.*, 2000, **34**, 4908–4916, DOI: 10.1021/es0013125.

- 9 R. P. Mason, J. R. Reinfelder and F. M. M. Morel, *Environ. Sci. Technol.*, 1996, **30**, 1835–1845, DOI: 10.1021/es950373d.
- 10 W. James, K. David, H. Gary and S. Anton, in *Handbook of Ecotoxicology*, CRC Press, 2nd edn, 2002.
- 11 C. Hammerschmidt and W. Fitzgerald, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2006, **51**, 416–424, DOI: 10.1007/s00244-005-0265-7.
- 12 Z. Pedrero, S. Mounicou, M. Monperrus and D. Amouroux, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2011, **26**, 187–194, DOI: 10.1039/c0ja00154f.
- 13 P. R. Becker, M. M. Krahn, E. A. Mackey, R. Demiralp, M. M. Schantz, M. S. Epstein, M. K. Donais, B. J. Porter, D. C. G. Muir and S. A. Wise, *Mar. Fish. Rev.*, 2000, **62**(3), 81–98.
- 14 V. L. St. Louis, A. E. Derocher, I. Stirling, J. A. Graydon, C. Lee, E. Jocksch, E. Richardson, S. Ghorpade, A. K. Kwan, J. L. Kirk, I. Lehnher and H. K. Swanson, *Environ. Sci. Technol.*, 2011, **45**, 5922–5928, DOI: 10.1021/es2000672.
- 15 R. Wagemann, E. Trebacz, G. Boila and W. L. Lockhart, *Sci. Total Environ.*, 1998, **218**, 19–31, DOI: 10.1016/s0048-9697(98)00192-2.
- 16 F. Caurant, M. Navarro and J.-C. Amiard, *Sci. Total Environ.*, 1996, **186**, 95–104, DOI: 10.1016/0048-9697(96)05087-5.
- 17 C. A. Eagles-Smith, J. T. Ackerman, J. Yee and T. L. Adelsbach, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2009, **28**, 568–577, DOI: 10.1897/08-245.1.
- 18 R. Wagemann, E. Trebacz, G. Boila and W. L. Lockhart, *Sci. Total Environ.*, 2000, **261**, 21–32, DOI: 10.1016/s0048-9697(00)00592-1.
- 19 M. Monperrus, R. C. Rodriguez Martin-Doimeadios, J. Scancar, D. Amouroux and O. F. X. Donard, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 4095–4102, DOI: 10.1021/ac0263871.
- 20 I. Rodriguez Pereiro, A. Wasik and R. Lobinski, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1998, **13**, 743–747.
- 21 J. Szpunar, R. Lobinski, A. Wasik, I. Rodriguez Pereiro and C. Dietz, *Anal. Commun.*, 1998, **35**, 331–335.
- 22 C. Mao Tseng, A. De Diego, F. M. Martin, D. Amouroux and O. F. X. Donard, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1997, **12**, 743–750.
- 23 K. Leopold, M. Foulkes and P. Worsfold, *Anal. Chim. Acta*, 2010, **663**, 127–138, DOI: 10.1016/j.aca.2010.01.048.
- 24 V. Perrot, V. N. Epov, M. V. Pastukhov, V. I. Grebenshchikova, C. Zouiten, J. E. Sonke, S. Husted, O. F. X. Donard and D. Amouroux, *Environ. Sci. Technol.*, 2010, **44**, 8030–8037, DOI: 10.1021/es101898e.
- 25 D. B. Senn, E. J. Chesney, J. D. Blum, M. S. Bank, A. Maage and J. P. Shine, *Environ. Sci. Technol.*, 2010, **44**, 1630–1637, DOI: 10.1021/es902361j.
- 26 D. Point, J. E. Sonke, R. D. Day, D. G. Roseneau, K. A. Hobson, S. S. Vander Pol, A. J. Moors, R. S. Pugh, O. F. X. Donard and P. R. Becker, *Nat. Geosci.*, 2011, **4**, 188–194, <http://www.nature.com/ngeo/journal/v4/n3/abs/ngeo1049.html#supplementary-information>.
- 27 R. D. Day, D. G. Roseneau, S. Berail, K. A. Hobson, O. F. X. Donard, S. S. Vander Pol, R. S. Pugh, A. J. Moors, S. E. Long and P. R. Becker, *Environ. Sci. Technol.*, 2012, **46**, 5327–5335, DOI: 10.1021/es2047156.
- 28 R. Das, V. J. M. Salters and A. L. Odum, *Geochem. Geophys. Geosyst.*, 2009, **10**, Q11012, DOI: 10.1029/2009gc002617.
- 29 N. Gantner, H. Hintelmann, W. Zheng and D. C. Muir, *Environ. Sci. Technol.*, 2009, **43**, 9148–9154, DOI: 10.1021/es901771r.
- 30 B. A. Bergquist and J. D. Blum, *Science*, 2007, **318**, 417–420, DOI: 10.1126/science.1148050.
- 31 W. Zheng and H. Hintelmann, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 2009, **73**, 6704–6715, DOI: 10.1016/j.gca.2009.08.016.
- 32 V. N. Epov, P. Rodriguez-Gonzalez, J. E. Sonke, E. Tessier, D. Amouroux, L. M. Bourgoin and O. F. X. Donard, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 3530–3538, DOI: 10.1021/ac800384b.
- 33 L. Yang and R. Sturgeon, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, **393**, 377–385, DOI: 10.1007/s00216-008-2348-6.
- 34 J. F. Uthe, J. Solomon and B. Grift, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1972, **55**, 583–589.
- 35 O. Clarisse and H. Hintelmann, *J. Environ. Monit.*, 2006, **8**, 1242–1247.
- 36 R. E. EPA Method 1631, *U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water*, August 2002, EPA-821-R-02-019, p. 38.
- 37 L. Laffont, J. E. Sonke, L. Maurice, H. Hintelmann, M. Pouilly, Y. Sánchez Bacarreza, T. Perez and P. Behra, *Environ. Sci. Technol.*, 2009, **43**, 8985–8990, DOI: 10.1021/es9019518.
- 38 J. Blum and B. Bergquist, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, **388**, 353–359, DOI: 10.1007/s00216-007-1236-9.
- 39 V. N. Epov, S. Berail, M. Jimenez-Moreno, V. Perrot, C. Pecheyran, D. Amouroux and O. F. X. Donard, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 5652–5662, DOI: 10.1021/ac100648f.
- 40 K. Kritee, T. Barkay and J. D. Blum, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 2009, **73**, 1285–1296, DOI: 10.1016/j.gca.2008.11.038.
- 41 D. York, *Can. J. Phys.*, 1966, **44**, 1079–1086, DOI: 10.1139/p66-090.
- 42 V. Taylor, B. Jackson and C. Chen, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **392**, 1283–1290, DOI: 10.1007/s00216-008-2403-3.
- 43 S. Christopher, R. Pugh, M. Ellisor, E. Mackey, R. Spatz, B. Porter, K. Bealer, J. Kucklick, T. Rowles and P. Becker, *Accredit. Qual. Assur.*, 2007, **12**, 175–187, DOI: 10.1007/s00769-006-0245-2.

Chapitre 8.

Détermination du $\delta^{13}\text{C}$ sur la molécule de méthylmercure par chromatographie gazeuse-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS)

Chapitre 8. Détermination du $\delta^{13}\text{C}$ sur la molécule de méthylmercure par chromatographie gazeuse-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS)

Résumé

Une des principales composantes critiques du cycle biogéochimique du Hg est la transformation du Hg inorganique en monométhylmercure. Ce processus aussi appelé méthylation est à ce jour très méconnu, bien qu'à l'origine de nombreuses études dues aux propriétés hautement toxiques et bio-accumulables du MMHg formé. Il semble que cette transformation soit majoritairement biotique faisant intervenir des bactéries sulfato-réductrice, mais d'autres micro-organismes ou des voies abiotiques peuvent aussi entrer en jeu. Ensuite, l'assimilation rapide du MMHg par les producteurs primaires et sa bio-amplification le long de la chaîne alimentaire est mieux documentée. Actuellement, comprendre où et comment le MMHg est produit à la base de l'écosystème aquatique reste un sujet de débat important.

Répondre à ces questions fondamentales sur l'origine de CH_3Hg est lié directement à la métrologie actuelle du Hg. Alors que les études en laboratoire et sur le terrain utilisent majoritairement les données de spéciation et de composition isotopique du Hg, l'idée de cette étude est de développer une technique analytique pour caractériser la composition isotopique de l'atome de carbone contenu dans la molécule de méthylmercure (CH_3Hg) dans les échantillons biologiques.

La méthode consiste en l'extraction préliminaire du MMHg de la matrice biologique validée dans le précédent chapitre (Masbou et al., 2013). La génération de formes volatiles pour analyses GC-IRMS se fait par classiquement par propylation ou éthylation. Cependant ces deux méthodes sont à l'origine d'ajout de groupements carbonés exogènes sur la molécule de CH_3Hg , problématique lors de la mesure de $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$.

Malgré la possibilité de corriger cet ajout de carbone, nous avons développé une technique alternative par halogénéation et production d'un composé iodé CH_3HgI . Différentes conditions d'expérimentations sont testées et un protocole strict de validation montre l'absence de fractionnement isotopique durant tout le processus de préparation et d'analyse d'une solution standard de CH_3Hg ($5000 \text{ ng}_{\text{CH}_3\text{Hg}} \cdot \text{g}^{-1}$). Aussi, l'absence de fractionnement isotopique en présence de matrice est démontré par l'analyse d'un échantillon biologique peu concentré (NRCC, TORT-2, $152 \text{ ng}_{\text{CH}_3\text{Hg}} \cdot \text{g}^{-1}$) préalablement « spiké » avec notre solution standard de CH_3Hg .

Chapitre 8. Détermination du $\delta^{13}\text{C}$ sur la molécule de méthylmercure par chromatographie gazeuse-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS)

Une première valeur de référence est proposée sur un matériel thon certifié IRMM-ERM-CE464, mesuré à $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}} = -22.1 \pm 1.2\text{‰}$ ($\pm 2\text{SD}$).

Cette première valeur est similaire à celle observé dans le phytoplancton de l'Atlantique ($\approx -21\text{‰}$) et différente de sédiments côtiers de la mer Adriatique ($\approx -25\text{‰}$). S'ajoutant à la signature $\delta^{202}\text{Hg}_{\text{MMHg}} = 0.62 \pm 0.13\text{‰}$ ($\pm 2\text{SD}$) et $\Delta^{199}\text{Hg}_{\text{MMHg}} = 1.82 \pm 0.06\text{‰}$ ($\pm 2\text{SD}$) déterminés dans le chapitre précédent (Hg-CSIA), ces signatures isotopiques sont compatibles avec la production in-situ dans la colonne d'eau, et la dégradation photochimique du CH_3Hg . Elles suggèrent aussi que le CH_3Hg est produit dans des environnements d'océan ouvert et non dans les sédiments côtiers.

Cette étude est actuellement en préparation pour publication.

Methylmercury $\delta^{13}\text{C}$ compound specific stable isotope analysis by gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry

*J. Masbou¹, D. Point^{*1}, G. Guillou², J.E. Sonke¹, P. Richard²*

¹Observatoire Midi-Pyrénées, Laboratoire Géosciences Environnement Toulouse, CNRS/IRD/Université Paul Sabatier Toulouse 3, 14 avenue Edouard Belin, 31400 Toulouse, France.

²UMR Littoral, Environnement et Sociétés (LIENSs), UMR 6250 CNRS-Université de La Rochelle, Institut du Littoral et de l'Environnement, 2 rue Olympe de Gouges, 17000 La Rochelle, France.

RECEIVED DATE

*Author for correspondence: david.point@ird.fr

Abstract

A critical component of the biogeochemical cycle of mercury (Hg) is to understand the transformation of inorganic mercury to the organometallic toxin monomethylmercury (CH_3Hg) occurs in the environment. Understanding this fundamental question has billion-dollar implication in terms of human health and global socioeconomical costs. Since most of Hg metrology has thus far investigated the concentration and/or the stable isotopic composition of the Hg atom embedded into CH_3Hg , the supposed paramount importance of the carbon side of the Hg cycle has been largely unexplored. In this study, we developed an original analytical technique for the precise and accurate determination of the $\delta^{13}\text{C}$ signature of the carbon atom present in the CH_3Hg compound in biological samples. The method consists of a first CH_3Hg selective extraction and purification method (SEM) of the biological matrix, followed by the halogenation of CH_3Hg as CH_3HgI for subsequent direct GC-IRMS analysis. A strict validation protocol showed the absence of isotopic fractionation during the entire process, even in the presence of matrix. A first consensus value was established for a in house CH_3Hg reference standard solution ($\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}} = -53.8 \pm 1.1 \text{‰}$, $\pm 2\text{SD}$) and for the tuna fish certified material IRMM-ERM-CE464 showing a $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ value of $-22.1 \pm 1.2 \text{‰}$ ($\pm 2\text{SD}$). Complementary to the recent measurement of Hg-CSIA $\delta^{202}\text{Hg}_{\text{CH}_3\text{Hg}} = 0.62 \pm 0.13 \text{‰}$ ($\pm 2\text{SD}$) and $\Delta^{199}\text{Hg}_{\text{CH}_3\text{Hg}} = 1.82 \pm 0.06 \text{‰}$ ($\pm 2\text{SD}$), Masbou et al., 2013) determined for the same material, this study opens the way for the analysis of the double stable isotopic composition of both Hg and C atoms at the molecular CH_3Hg level which may improve our understanding of the origin of this potent neurotoxin in the environment.

Introduction

The toxicity of Hg is directly related to its chemical forms. Biogenic organometallic compounds that are naturally produced in aquatic ecosystems such as methylmercury (CH_3Hg) are known to be potent neurotoxins (Choi and Grandjean, 2008) and to bioaccumulate along aquatic food chains (Mason et al., 1995). Marine sea food consumption represents the main source of human exposure (Sunderland and Mason, 2007), with socio-economical costs estimated to several billions of dollars/year worldwide (Trasande et al., 2005). The global social, health and economic implications associated with Hg exposure are ultimately related to the poorly known process of microbial methylation.

CH_3Hg production is thought to be mainly controlled by the activity of sulfate reducing bacteria (Benoit et al., 2001; Compeau and Bartha, 1985; Ranchou-Peyruse et al., 2009), yet other microorganisms and possibly abiotic pathways may also be at play. The rapid assimilation of CH_3Hg by primary producers (phytoplankton) (Mason et al., 1996) and further biomagnification along the foodweb is well documented (Becker et al., 2000; St. Louis et al., 2011). Yet, understanding where, how and when CH_3Hg is produced at the base of aquatic ecosystems remains a subject of ongoing debate. Lake, coastal and marine sediments have long been identified as important sites for microbial Hg methylation. However, relating elevated open ocean fish CH_3Hg levels to coastal sediment CH_3Hg sources is unrealistic (Mason, 2013). Recent marine studies on CH_3Hg provide mounting evidence for in situ water column production of CH_3Hg as a source to marine food webs (Cossa et al., 2011; Heimbürger et al., 2010; Mason and Fitzgerald, 1993; Sunderland et al., 2009).

Answering fundamental questions on the origin of CH_3Hg is directly driven by the state of Hg metrology. Traditional Hg speciation techniques involve a gas chromatographic separation coupled to a sensitive Hg detector such AFS or ICP-MS (Bloom and Fitzgerald, 1988). These techniques have permitted measurement of CH_3Hg concentrations in a wide range of key compartments of the biogeosphere (biota, oceans, atmosphere, food chain, sediments, soils). The increasing interest and use of mass spectrometry in Hg research has allowed researchers to investigate the potential of using enriched Hg stable isotopes in laboratory or field tracer studies to quantify the kinetics of Hg transformations and/or its transfer among compartments (Hintelmann et al., 1995; Monperrus et al., 2007). More recently, the analysis of the natural stable isotopic variations of Hg by cold vapor multi-collector inductively coupled plasma mass spectrometry (CV-MC-ICPMS) in biogeomatrices provides a new angle on tracking Hg sources and dynamics (Das et al., 2013; Day et al., 2012; Gantner et al., 2009; Perrot et al., 2010; Point et al., 2011; Senn et al., 2010). These studies revealed that Hg is one of the rare elements on earth displaying both mass dependent isotope fractionation (MDF) and mass independent isotope fractionation (MIF), generally assessed by the $\delta^{202}\text{Hg}$ and $\Delta^{199}\text{Hg}$ isotope

signatures respectively. Mercury MDF originates from various biotic/abiotic reactions leading to large $\delta^{202}\text{Hg}$ variations from -2.3‰ to 2.6‰ observed in fish tissues (Bergquist and Blum, 2007; Das et al., 2009; Yin et al., 2010). On the contrary, processes inducing Hg MIF are less diverse, and originate mainly from the photochemical breakdown of aqueous CH_3Hg and iHg complexes. Until now, most measurements of $\delta^{202}\text{Hg}$ and $\Delta^{199}\text{Hg}$ signatures in environmental samples have been essentially performed on total Hg concentrations, but recent analytical developments in the field of Hg compound specific stable isotopic analysis (Hg-CSIA) opens up the possibility to trace Hg dynamics at the molecular level (Clough et al., 2013; Epov et al., 2008; Masbou et al., 2013). Interestingly the analytical trends in Hg metrology indicate that the main angle of investigation over time has focused on manipulating or characterizing the isotopic signature of the Hg atom in CH_3Hg . Little to no attention has been devoted to the isotopic variations of the carbon (and/or hydrogen) atom in CH_3Hg .

In this study, we develop a new analytical approach that completes the existing toolbox for Hg research that allows investigating the largely unexplored carbon side of the CH_3Hg cycle. Our objective was in particular to develop a methodology to trace the carbon sources for CH_3Hg production in the environment. The recent analytical developments in the field of light element (C, H, N, O) compound specific stable isotopic analysis ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{D}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{18}\text{O}$ -CSIA) by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS) have permitted the analysis of the $\delta^{13}\text{C}$ signature of individual organic compounds such as amino acids ($\delta^{13}\text{C}$ AA), greenhouse gases ($\delta^{13}\text{C}$ CH_4 , $\delta^{13}\text{C}$ CO_2), organic anthropogenic contaminants ($\delta^{13}\text{C}$, PCB, HAP), but also biogenic organometallic arsenic compounds ($\delta^{13}\text{C}$ trimethyl-arsine oxide (TMA₃O)). Here, we developed the first method to our knowledge allowing the $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ determination in biological materials.

Experimental section

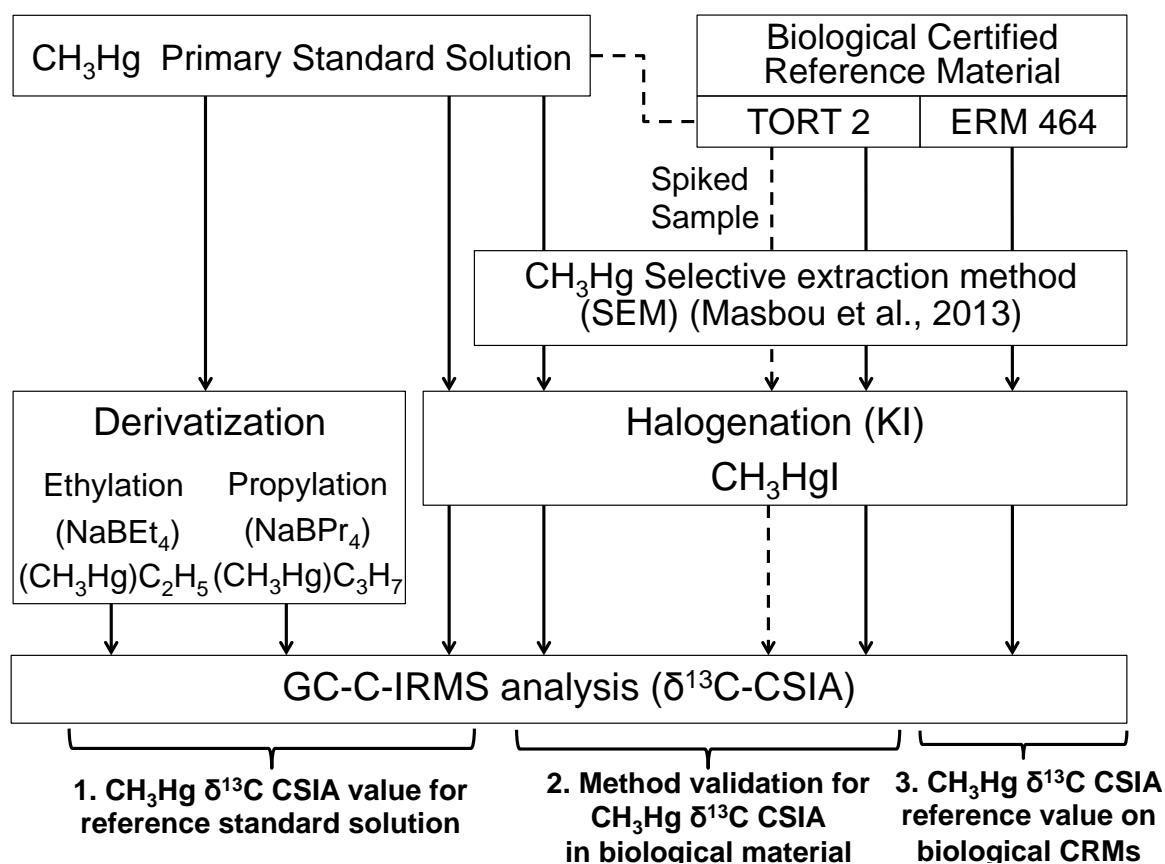


Figure 1: Operating procedure used in this work for: 1. Establishing reference $\delta^{13}\text{C}$ values for CH_3Hg on a primary standard solution by comparing different derivatization and halogenation procedures involving different carbon atoms addition to the native CH_3 group, 2. Validating the SEM method (Masbou et al., 2013) by analyzing the CH_3Hg $\delta^{13}\text{C}$ signature of the primary CH_3Hg standard solution processed by the SEM and also spiked into a natural low CH_3Hg reference material digest (TORT 2), and 3. Establishing $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ values of a natural biological reference material (ERM-CE 464) using the optimized and validated SEM protocol.

Reagents, Standards, and Reference material

Millipore $18.6 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ultrapure water, bidistilled nitric (HNO_3 , $15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and hydrochloric (HCl , $10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) acids were used for preparation of all solutions throughout this study. Sodium bromide (NaBr , Ultra grade 99.5%), anhydrous cupric sulphate (CuSO_4 , reagent grade 99%+), sodium thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, reagent grade 98%), stannous chloride (SnCl_2 , reagent grade 98%), sodium acetate (CH_3COONa , ACS grade 99%+), methanol (CH_3OH , anhydrous 99.8%), toluene (anhydrous 99.8%), hexane (anhydrous $\geq 95\%$) and sulphuric acid (H_2SO_4 , ACS grade 95-98%) were purchased from Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Different bottles of 2,2,4-trimethylpentane (iso-octane) were tested to check for the presence of the lowest carbon impurities. Best blank conditions were

obtained using Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA) anhydrous 99.8% grade iso-octane. Ultra grade glacial acetic acid (CH_3COOH , 99%) was purchased from Avantor™ (Netherlands). Sodium tetra-n-propylborate (NaBPr_4) and sodium tetra-n-ethylborate (NaBEt_4 , 98%, packed under argon, Merseburger Spezialchemikalien®, Germany) were prepared daily and stored at -18°C . All polypropylene or Teflon labware used in this study was soaked twice in 10 % (v/v) commercial grade HNO_3 for one day at 100°C before rinsing with MQ water and drying under a laminar flow hood. Glass labware has been cleaned by pyrolysis at 530°C during 2 hours before use.

The primary CH_3Hg reference standard stock solution used in this study was prepared from methylmercury chloride salt (CH_3HgCl , 96%, Stock #37123, Lot #118R035) purchased from Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA), dissolved in a 10% (v/v) methanol/water solution. Diluted standard solutions of this primary reference stock solution were prepared in 0.5% w/w bi-distilled HCl or 5mM sodium thiosulfate solution for the derivatization and halogenation experiments respectively. Inorganic Hg NIST SRM 3133 solution (NIST, USA) was used in this work. Diluted standard solutions were prepared in 0.5% w/w bi-distilled HCl for the derivatization experiment.

Two biological certified reference materials (CRMs) with different CH_3Hg concentration level were used in this study. TORT-2 freeze-dried, defatted lobster hepatopancreas tissue was obtained from the National Research Council Canada (NRCC). TORT-2 is characterized by low certified CH_3Hg concentrations $0.163\pm 0.014 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (as CH_3Hg) which correspond to $9\pm 1 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ of carbon as CH_3Hg , making it suitable to be used as a blank control matrix material to investigate the robustness of the method developed in this work for $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ determination in biological materials. The second biological CRM used in this work was ERM-CE464 non-defatted freeze-dried tuna fish originating from the Mediterranean Sea, and obtained from the Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM, Belgium). ERM-CE464 is characterized by relatively high certified CH_3Hg concentration levels of $5.50\pm 0.17 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (as CH_3Hg) corresponding to $306\pm 10 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ of carbon as CH_3Hg .

Instrumentation

GC-C-IRMS

All $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ measurements were performed by GC-IRMS (Thermo Scientific). This instrumental platform consists of a Trace GC Ultra equipped with a Triplus Autosampler coupled to Delta V Advantage IRMS detector with an Isolink GC coupling interface. Instrumental parameters (GC and IRMS) are detailed in Table 1. A fused silica Agilent DB-5 column was used for the separation of propylated and ethylated CH_3Hg compounds. A fused silica Restek RTX-5 column with a lower film thickness ($0.1\mu\text{m}$) was privileged in the case of halogenated CH_3Hg compounds for improved chromatographic resolution, and suitable for $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ measurements. A modified peak

Chapitre 8. Détermination du $\delta^{13}\text{C}$ sur la molécule de méthylmercure par chromatographie gazeuse-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS)

detection method has been applied in the case of CH_3HgI $\delta^{13}\text{C}$ CSIA in order to reduce the influence of increased chromatographic baseline values when high pre-concentration factors (≈ 200) obtained by significant solvent evaporation is required.

ID-GC-ICPMS

Species specific isotope dilution GC (Thermo Scientific® Trace Ultra)-HR-ICPMS (Thermo Scientific® Element-XR) analysis was employed in this work for all CH_3Hg concentration measurements and recovery checks (Point et al., 2008). Instrumental parameters (GC and HR-ICPMS) are detailed in Table S1.

Table 1: Instrumental conditions for CH_3Hg $\delta^{13}\text{C}$ CSIA by GC-C-IRMS

GC parameters		
	Derivatization	Halogenation
Column	Agilent DB-5 (30m, 0.25 mm I.D., 0.25 μm)	Restek RTX-5 (30m, 0.25 mm I.D., 0.1 μm)
GC Program	Initial temp: 40°C Hold Time: 2 min Ramp: 5°C/min - 100°C Hold Time: 2 min Ramp: 50°C/min - 250°C Hold Time: 1 min	Initial temp: 40°C Hold Time: 2min Ramp: 10°C/min - 120°C Hold Time: 0 min Ramp: 35°C/min - 250°C Hold Time: 1 min
Carrier gaz (He)	1.4 mL/min	1.4 mL/min
Injector Set Up	250°C Splitless Mode 3.0 mm ID Single Taper Inlet Liner Injection volume: 1 μl	250°C Splitless Mode 3.0 mm ID Single Taper Inlet Liner Injection volume: 3 μl
Hg Compounds Retention times (Rt)	(CH_3Hg) C_2H_5 : 414s Hg(C_2H_5) $_2$: 633s	(CH_3Hg) C_3H_7 : 533 s Hg(C_3H_7) $_2$: 879 s CH_3HgI : 496s
IRMS parameters		
	Derivatization	Halogenation
IR-MS Set Up	Delta V Advantage IRMS (Thermo Scientific, Bremen, Germany) GC-Isolink system (Thermo Scientific, Bremen, Germany) Combustion furnace: 1000°C	
Peak detection methods	ISODAT "Individual Background" method Start slope: 0.4mV.s ⁻¹ End Slope: 0.2mV.s ⁻¹ Background time=5s	ISODAT "CalcMean background" method Start slope: 2mV.s ⁻¹ End Slope: 2mV.s ⁻¹ Background time=1s

CH_3Hg selective extraction method (SEM) for GC-C-IRMS

The CH_3Hg selective extraction method (SEM) used in this study was modified from the original SEM (Masbou et al., 2013). It allows the extraction of a larger quantity of biological material in order to obtain sufficient CH_3Hg for GC-C-IRMS analysis. In the original method, about 1g of biological material was extracted during 1h (420 rpm lengthwise agitation on a horizontal shaking table) in a 50 mL centrifuge tubes with 5 mL of acidic sodium bromide (30% w/w NaBr in 4 mol.L⁻¹ H_2SO_4), 10 mL of aqueous cupric sulfate (2.5% w/w CuSO_4) and 10 mL of toluene. Then the recovered toluene fraction that contains CH_3HgBr was back-extracted with 4 mL of a 5 mM sodium thiosulfate solution to get an aqueous and stable CH_3HgS complex. In the modified SEM, several 1g

sample replicates (up to n=4) were extracted during 1h (420 rpm lengthwise agitation on a horizontal shaking table) in 50 mL centrifuge tubes with 5 mL of acidic sodium bromide (30% w/w NaBr in 4 mol.L⁻¹ H₂SO₄), 10 mL of aqueous cupric sulfate (2.5% w/w CuSO₄) and 10 mL of toluene. The toluene fractions of each individual sample replicate were combined together. The resulting pooled toluene fraction was then processed as indicated before with a back extraction using 4 mL of a 5mM sodium thiosulfate solution. Verification of the quantitative extraction of CH₃Hg from up to 4g of sample was verified by GC-HR-ICP-MS (See ESI Section for details).

Derivatization versus Halogenation conditions for CH₃Hg $\delta^{13}\text{C}$ CSIA by GC-C-IRMS

Methylmercury $\delta^{13}\text{C}$ signatures measured in this work were expressed relative to a high purity CO₂ reference working gas (carbon dioxide N48, Messer Griesheim, Frankfurt, Germany). ¹³C/¹²C ratios are normalized by the Pee Dee Belemnite (PDB) reference standard and expressed in δ notation:

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = \left(\frac{\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{sample}}}{\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{PDB}}} - 1 \right) \times 1000$$

As indicated in Figure 1, derivatization versus halogenation conditions were tested on the same CH₃Hg standard solution to establish a $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ consensus value using three independent methods.

The derivatization method (Figure 1) represents an indirect approach for the determination of $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ since the isotopic contribution of the exogenous carbon atoms present on the ethyl- and propyl- groups after CH₃Hg derivatization (CH₃Hg(C₂H₅) in the case of ethylation and CH₃Hg(C₃H₇) in the case of propylation) needs to be accounted and corrected for. By adding an inorganic Hg standard to the CH₃Hg standard before derivatization, the resulting two derivatized Hg compounds in the case of ethylation are CH₃Hg(C₂H₅) and Hg(C₂H₅)₂, and CH₃Hg(C₃H₇) and Hg(C₃H₇)₂ in the case of propylation. The $\delta^{13}\text{C}$ signatures of the carbon atoms of the ethyl and propyl groups can thus be determined on the Hg (C₂H₅)₂ and Hg (C₃H₇)₂ peaks. Subsequently a mass balance can be applied to determine the endogenous $\delta^{13}\text{C}$ signature of CH₃Hg.

In the case of ethylation (Figure 2a), $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ signature can be estimated from the following equation:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}} = 3 \times \delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}(\text{C}_2\text{H}_5)} - 2 \times \delta^{13}\text{C}_{\text{Hg}(\text{C}_2\text{H}_5)_2}$$

In the case of propylation (Figure 2b), $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ signature can be estimated from the following equation:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}} = 4 \times \delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}(\text{C}_3\text{H}_7)} - 3 \times \delta^{13}\text{C}_{\text{Hg}(\text{C}_3\text{H}_7)_2}$$

The ethylation and propylation conditions used in this work follow the standard procedures used for precise and accurate quantification of CH_3Hg by GC-ICP-MS (Point et al., 2008). Briefly, CH_3Hg and iHg standards solutions were derivatized with 0.1 mL of daily prepared $\text{NaB}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$ and $\text{NaB}(\text{C}_3\text{H}_7)_4$ (20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) in a 5 mL acetate buffer solution (0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, acetic acid, $\text{pH}=3.9$) and in the presence 0.5 mL of hexane. Inorganic Hg concentration levels were spiked at the same level as CH_3Hg . Samples were hand-shaken for 5 min, before collecting the hexane phase, which was subsequently stored in GC vials at -20°C before analysis. Preliminary work investigating the effect of different derivatization conditions on $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ and the concentration of CH_3Hg was conducted to establish the optimum ethylation, propylation reagent quantities (See ESI for details) and CH_3Hg concentration levels for accurate CH_3Hg $\delta^{13}\text{C}$ CSIA (See Figure 3a and 3b).

The halogenation method (Figure 2c) represents a direct approach for $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ since no addition of endogenous carbon atoms is required. This approach consists of forming a CH_3Hg halide complex that can be back extracted into a solvent and analyzed directly by GC-C-IRMS. In this work, we used previously published operating protocols by (Uthe et al., 1972) and (Wagemann et al., 1997) to form a CH_3HgI complex. Briefly, CH_3HgI is produced by mixing CH_3Hg standard in 5mM sodium thiosulfate solution (5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ as CH_3Hg , 2g) with 0.5 mL of a 3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ potassium iodide solution. The mixture is vortexed during 30s and then kept in the dark during 10 min. The aqueous CH_3HgI complex is subsequently extracted into 10 mL of iso-octane by vortexing the solution for 2 mins after iso-octane addition. When necessary, CH_3HgI standard solutions in iso-octane were preconcentrated under a stream (0.5 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) of nitrogen at room temperature. Given that CH_3Hg -thiosulfate complexes are obtained at the end of the SEM, applying the halogenation method to form a CH_3HgI complex was found particularly suitable to determine precise $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ values for both the CH_3Hg reference standard solution and for a biological reference material.

Three consecutive steps were taken to achieve accurate and precise CH_3Hg $\delta^{13}\text{C}$ CSIA (Figure 1). The first step consisted of establishing reference $\delta^{13}\text{C}$ values for CH_3Hg on a primary reference standard solution by comparing the results of independent extraction and chromatography methods. The second step consisted of testing and validating the methodology of CH_3Hg $\delta^{13}\text{C}$ CSIA on biological samples using a recently published CH_3Hg selective extraction and purification method. The third step consisted of applying the finalized and validated methodology to assign preliminary $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ values to a tuna fish biological reference material.

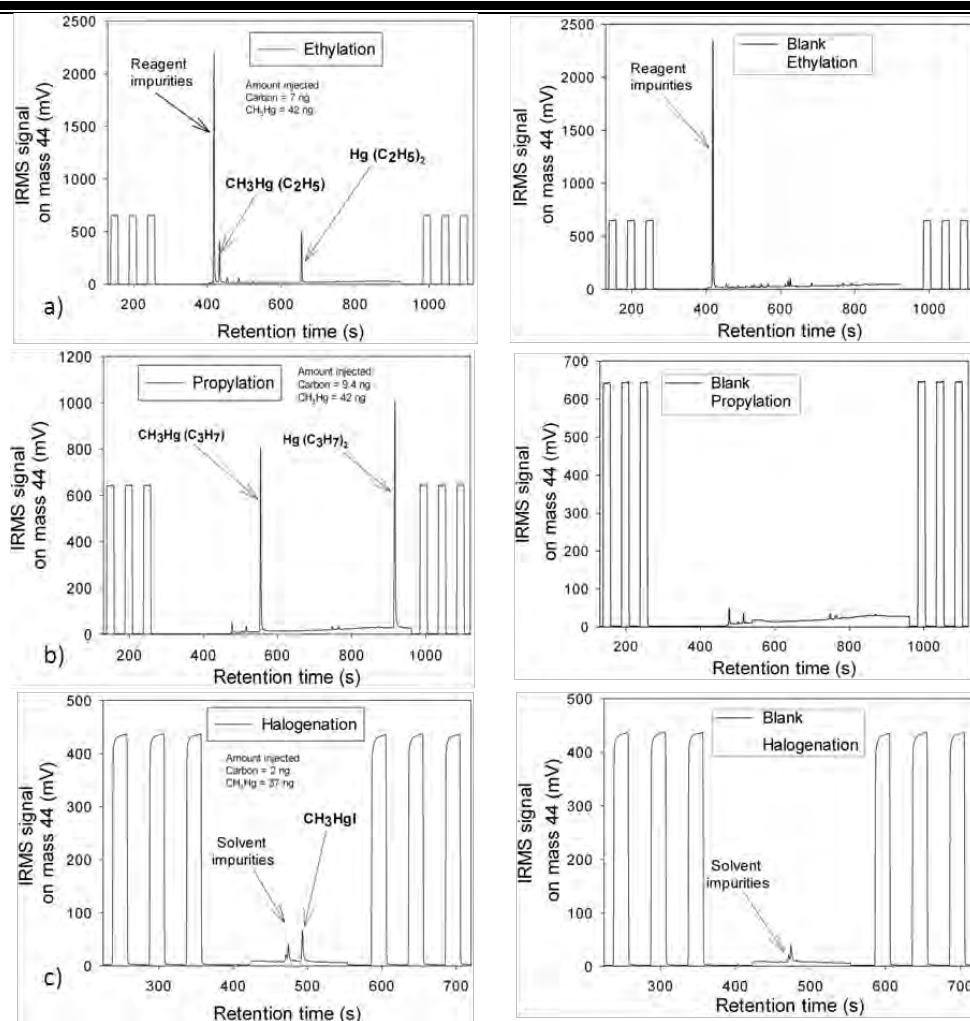


Figure 2: Example of GC-C-IRMS chromatograms of a derivatized CH_3Hg standard in hexane by a) ethylation ($\text{CH}_3\text{Hg}(\text{C}_2\text{H}_5)$), b) propylation ($\text{CH}_3\text{Hg}(\text{C}_3\text{H}_7)$) and an iodine halogenated CH_3Hg standard in isooctane c) CH_3HgI . Note that in the case of derivatized CH_3Hg compounds, inorganic Hg standards are spiked into the solution and co-derivatized with CH_3Hg to allow for the internal correction of the $\delta^{13}\text{C}$ contribution of the respective ethyl and propyl groups attached to the CH_3Hg molecule.

Results and discussion

CH_3Hg stock solution

Derivatization method

GC-C-IRMS requires much higher CH_3Hg concentrations than GC-ICPMS. Preliminary experiments were therefore conducted to (i) investigate the optimum quantity of derivatizing agents (NaBeT_4 and NaBPr_4) required to obtain quantitative derivitization of large amounts of CH_3Hg , and (ii) to investigate the optimum concentration range of CH_3Hg to obtain accurate and precise $\delta^{13}\text{C}$

signatures of $\text{CH}_3\text{Hg}(\text{C}_2\text{H}_5)$ and $\text{CH}_3\text{Hg}(\text{C}_3\text{H}_7)$, and $\text{Hg}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ and $\text{Hg}(\text{C}_3\text{H}_7)_2$ that are needed to estimate the original $\delta^{13}\text{C}$ signature of the carbon atom of CH_3Hg . Results from these experiments are displayed in ESI_Figure 1, in Figure 3a and Figure 3b.

We find that the use of typical NaBEt_4 and NaBPr_4 concentrations used in GC-ICPMS studies ($20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 0.1 mL) was sufficient to quantitatively derivatize $28 \text{ }\mu\text{g}$ of CH_3Hg ($1.6 \text{ }\mu\text{g}$ of carbon) and $20 \text{ }\mu\text{g}$ of iHg for precise $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ (ESI_Figure S1). At these concentration levels, the alkylated CH_3Hg peak area represented $2.31\pm 0.45\text{V}$ and $1.54\pm 0.12\text{V}$ ($\pm 2\text{SD}$, $n=3$ injections) for $\text{CH}_3\text{Hg}(\text{C}_3\text{H}_7)$ and $\text{CH}_3\text{Hg}(\text{C}_2\text{H}_5)$ respectively, with the difference in intensity being proportional to the amount of carbon atoms for each derivatized CH_3Hg compound. A second derivatization of the remaining solution did not reveal any residual peaks suggesting that CH_3Hg derivitization was quantitative during the first derivitization step and the transfer of the alkylated CH_3Hg forms into the hexane phase. Isotopic mass balance calculations detailed in the material and method section showed identical $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ values of $-54.6\pm 1.9\text{‰}$ ($\pm 2\text{SD}$, $n=18$ injections) and $-54.5\pm 1.5\text{‰}$ ($\pm 2\text{SD}$, $n=18$ injections) for propylation and ethylation respectively.

We subsequently used the optimized concentration of derivatizing agent as determined above (20 mg/mL , 0.1 mL NaBEt_4 and NaBPr_4), and investigated $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ over an analyte mass range of $5\text{-}80 \text{ }\mu\text{g}$ of CH_3Hg ($0.28\text{-}4.45 \text{ }\mu\text{g C}$) while keeping iHg mass constant ($20 \text{ }\mu\text{g}$, Figure 3a and 3b). GC-C-IRMS calibrations curves showed similar relative sensitivity (peak area/ $\text{ngC}_{\text{injected}}$ in $\text{V}/\text{ngC}_{\text{injected}}$) when signals were normalized to the amount of carbon injected for each alkylated Hg compound: $0.219\pm 0.005 \text{ V}/\text{ngC}_{\text{injected}}$ and $0.209\pm 0.002 \text{ V}/\text{ngC}_{\text{injected}}$ for NaBPr_4 and NaBEt_4 with values ranging from 0.69 V (3.1 ngC) to 4.07 V (18.8 ngC) for propylation and from 1.06 V (4.7 ngC) to 3.95 V (18.8 ngC) for ethylation. In terms of isotopic composition, homogenous CH_3Hg $\delta^{13}\text{C}$ values were observed when varying the $\text{CH}_3\text{Hg}/\text{iHg}$ concentration ratio from 0.25 to 4 with average CH_3Hg $\delta^{13}\text{C}$ values of $-54.9\pm 1.7\text{‰}$ ($\pm 2\text{SD}$, $n=5$), and $-55.2\pm 0.9\text{‰}$ ($\pm 2\text{SD}$, $n=5$) using NaBPr_4 or NaBEt_4 derivatizing agents. These values indicate that in the case of quantitative derivitization yields and using iHg as an internal standard for correcting the isotopic contribution of the alkyl groups added to CH_3Hg during the derivitization reactions, precise and reproducible $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ can be achieved.

Halogenation method

With only a single carbon atom present in CH_3HgI , a higher concentration of the standard ($\text{CH}_3\text{Hg}=123 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), prepared in 5mM sodium thiosulfate, was required to achieve a similar sensitivity as the propylation and ethylation experiments. Typical reagent conditions from (Uthe et al., 1972) and (Wagemann et al., 1997) as described in the material and method section were used (2 mL CH_3Hg of $123 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ in 5 mM TS , 0.5 mL KI $3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and 10 mL iso-octane). Analyte signals obtained under these conditions were low (peak area= 0.206 V , peak height at mass $44 = 91 \text{ mV}$ for $2.1 \text{ ngC}_{\text{injected}}$) because of the need for a larger volume of solvent to quantitatively back-extract CH_3HgI .

An additional solvent evaporation step was therefore required to preconcentrate CH_3HgI . In order to evaluate the effect of solvent evaporation on $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ we varied the pre-concentration factors. (Figure 3c). Firstly, the linear relationship ($r^2=0.99$) obtained between the peak area and the amount of carbon injected confirmed that no CH_3Hg was lost during the iso-octane evaporation step. IRMS sensitivity reached 0.125 ± 0.005 V/ng $\text{C}_{\text{injected}}$, which corresponds exactly to the 40% relative drop in IRMS sensitivity observed when the propylation and ethylation experiments were performed. Given that both GC-C-IRMS experiments were performed on different dates (propylation and ethylation, September 2012, and halogenation, June 2014), the relative sensitivity of the instrument was examined by comparing the CO_2 reference gas signal intensity for the two dates (signal at mass 44= 7460mV in sept 2012, and 4500mV in June 2014). This indicates that the difference in sensitivity was instrument dependent, and likely related to signal optimization on the two dates. Once corrected from this bias, IRMS sensitivity for halogenation was calculated to be 0.207 V/ng $\text{C}_{\text{injected}}$, which is consistent with the sensitivity found for the propylation (0.219 ± 0.005 V/ng $\text{C}_{\text{injected}}$) and ethylation (0.209 ± 0.002 V/ng $\text{C}_{\text{injected}}$) experiments. A second halogenation step performed on the remaining aqueous phase after the first halogenation did not revealed an additional CH_3HgI peak, confirming the quantitative transfer of CH_3HgI into the organic phase prior to GC-C-IRMS analysis. Over the CH_3HgI concentration range investigated (2 to 16 ng of C injected), $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ showed similar values with a mean value of $-54.0\pm 0.7\text{‰}$ ($\pm 2\text{SD}$, $n=20$ injections).

In summary, a comparison of the CH_3Hg $\delta^{13}\text{C}$ signatures of the same in-house CH_3Hg standard solution shows non-significant differences between indirect ethylation ($-55.2\pm 0.9\text{‰}$ ($\pm 2\text{SD}$)) and propylation ($-54.9\pm 1.7\text{‰}$ ($\pm 2\text{SD}$)) and direct halogenation ($-54.0\pm 0.7\text{‰}$ ($\pm 2\text{SD}$)) methods. The precision of $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ measurement by the halogenation method appears to be significantly higher ($\approx 0.7\text{‰}$) by a factor two relative to the propylation and ethylation methods ($\approx 1.5\text{‰}$). This difference is likely related to the larger uncertainty budget of the propylation and ethylation methods where the $\delta^{13}\text{C}$ CISA of two individual Hg compounds needs to be combined for estimating the endogenous signature of CH_3Hg .

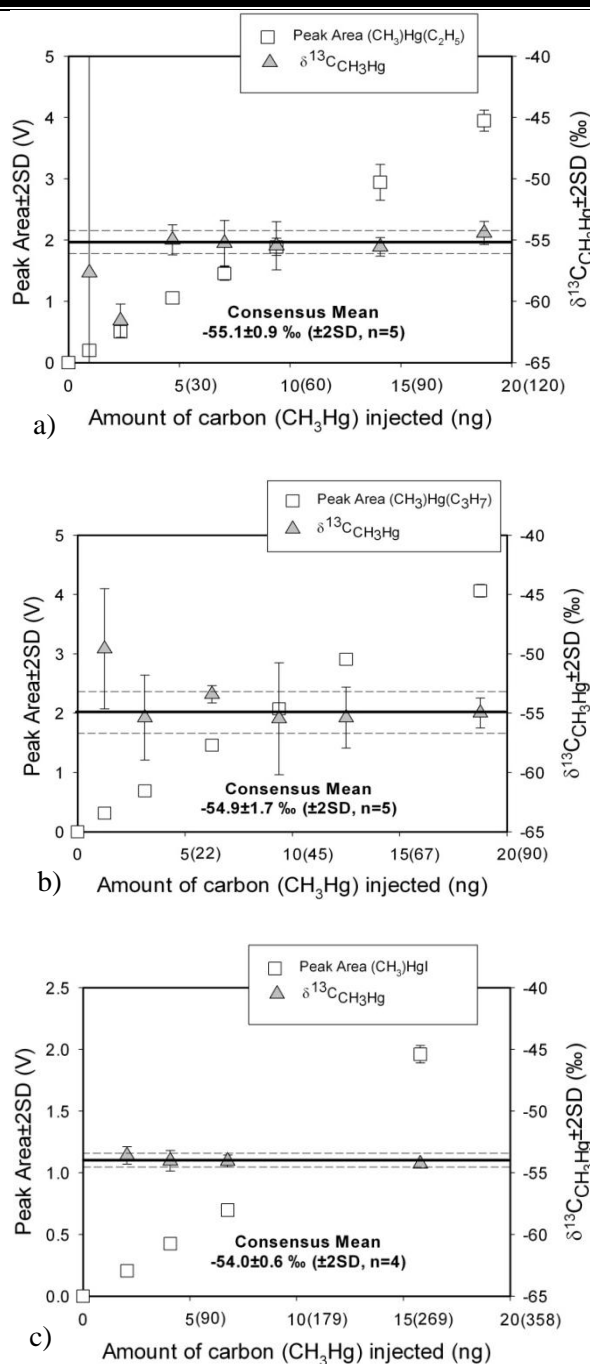


Figure 3: Influence of the concentration of CH_3Hg injected (expressed as the amount (ng) of C) on CH_3Hg $\delta^{13}\text{C}$ signatures measured by GC-C-IRMS: ethylation (a), propylation (b) and iodide halogenation (c) of the same CH_3Hg primary standard solution. The $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ values reported in a) and b) correspond to the estimated native $\delta^{13}\text{C}$ signature of CH_3Hg after correction of the ethyl and propyl group $\delta^{13}\text{C}$ signatures of $\text{CH}_3\text{Hg}(\text{C}_2\text{H}_5)$ and $\text{CH}_3\text{Hg}(\text{CH}_3\text{H}_7)$ respectively, and determined on $\text{Hg}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ and $\text{Hg}(\text{C}_3\text{H}_7)_2$ peaks in the same chromatograms (See Figure 2). Internal correction equations are detailed in the method section. No correction is required in the case of CH_3HgI since no carbon atom is added, allowing for direct and more precise $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$.

Long term reproducibility and determination of a consensus mean for CH_3Hg stock solution

The long term reproducibility of the methods was evaluated through repeated injection of 8 ngC for propylation and 7ngC for halogenation over 3 days. CH_3Hg $\delta^{13}\text{C}$ results are summarized in Table 2 (and ESI_Figure 2). Overall, the long-term $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ values were $-53.9\pm 1.5\%$ ($\pm 2\text{SD}$, $n=25$ injections) and $-53.6\pm 0.7\%$ ($\pm 2\text{SD}$, $n=23$ injections) for propylation and halogenation respectively. As detected during the previous experiments, $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ measurement variability is larger for the propylation and ethylation methods. However, within the uncertainties, the similar $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ values obtained using three independent preparation and analytical methods confirm their use for $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ determination of artificial CH_3Hg standard solutions. With the absence of statistical differences among the methods, all the $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ data obtained were combined in a consensus mean value of $-53.8\pm 1.1\%$ ($\pm 2\text{SD}$) for the Sigma Aldrich CH_3Hg reference standard solution used in this work.

Table 2: Synthesis of $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ values obtained for the CH_3Hg primary standard solution comparing short term and long term experiments with derivatization versus halogenation conditions. The consensus mean value represents the $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ mean average of all long term propylated and halogenated. The long term reproducibility was evaluated by repeated injection of a 8 ng.C (36 ng. CH_3Hg) propylated CH_3Hg standard over a period of 3 days and of a 2 to 16 ng.C (37-283 ng. CH_3Hg) halogenated CH_3HgI standard over a period 6 days.

	Propylation Experiments* $\text{CH}_3\text{Hg}(\text{C}_2\text{H}_5)$ (‰)	Ethylation Experiments* $\text{CH}_3\text{Hg}(\text{C}_3\text{H}_7)$ (‰)	Long term reproducibility Propylation 8 ng.C /3days (‰)	Halogenation Experiments (CH_3HgI) (‰)	Long term reproducibility Halogenation 7 ng.C /3days (‰)	Long term reproducibility Halogenation 2-16 ng.C /6days (‰)	Overall Consensus Mean (‰)
$\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ $\pm 2\text{SD}(\%$ (n injection)	-54.8 ± 1.8 (33)	-54.9 ± 2.2 (30)	-53.9 ± 1.5 (25)	-54.0 ± 0.7 (12)	-53.6 ± 0.7 (23)	-53.7 ± 0.9 (73)	-53.8 ± 1.1 (98)

* Data in the plateau conditions from Figure 3 and S1

Validation of the SEM for $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ determination on biological samples

In the case of biological samples, the SEM has been demonstrated to quantitatively extract and recover CH_3Hg from up to 1 g of finely ground biological tissue into a final solution of 5mM sodium thiosulfate (Masbou et al., 2013). In the ESI section we demonstrate that multiple 1g extracts of biological material can be combined (ESI_Table 2, ESI_Figure 4) to extract CH_3Hg from several grams of material to preconcentrate CH_3Hg (Masbou et al., 2013). In general, accurate $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ measurement requires quantitative extraction of CH_3Hg from the sample to the sodium thiosulfate solution and to the organic phase that is analyzed by GC-C-IRMS (Masbou et al., 2013). Preliminary attempts to derivatize CH_3Hg , in the presence of large amounts of biological matrix, in a 5mM thiosulfate solution using both propylation and ethylation were found unsuccessful. Likely, the strong $\text{CH}_3\text{Hg-S}$ bond (also documented elsewhere, Clarisse et al., 2008) inhibits derivatization and results in

low yields <5%. On the contrary, the halogenation method has successfully proven to quantitatively extract CH_3Hg in the presence of thiosulfate as the CH_3HgI complex by back extraction into a solvent (Uthe et al., 1972). The quantitative extraction of CH_3Hg in 5mM thiosulfate solution using the halogenation method was confirmed in this study by GC-HR-ICP-MS (See ESI section). For these reasons, the halogenation method has been privileged to process the SEM extracts of CH_3Hg in thiosulfate for $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ determination by GC-C-IRMS.

We subsequently tested the combined SEM and halogenation methods on the in-house CH_3Hg standard, in order to make sure that the chemicals used in the SEM (CuSO_4 , KBr and thiosulfate) do not affect quantitative extraction. The test conditions were equivalent to extracting 4g of ERM-CE464 with $5.12 \pm 0.17 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ CH_3Hg . Table 3 shows that extracting 4 g of a $5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ CH_3Hg standard solution by the SEM, followed by halogenation and a final evaporation/preconcentration step results in a $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ value of $-53.8 \pm 0.4\text{‰}$. This value is identical to the consensus mean value obtained for the same CH_3Hg standard without the SEM ($-53.8 \pm 1.1\text{‰}$). Comparison of the sensitivity factor obtained after processing 4g of a $5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ CH_3Hg standard by the SEM ($0.12 \text{ V}/\text{ngC}_{\text{injected}}$) to the sensitivity obtained when directly halogenating a CH_3Hg standard in thiosulfate ($0.125 \pm 0.005 \text{ V}/\text{ngC}_{\text{injected}}$, without SEM) indicated a recovery factor of 98%. This confirms a quantitative transfer of CH_3Hg from the initial standard solution to the final evaporated iso-octane solution injected in the GC-C-IRMS. These results suggest the absence of carbon isotopic fractionation artifacts on CH_3Hg standards processed by the SEM.

In a second step, we investigated the ability of the SEM-halogenation method to handle the same CH_3Hg quantity as detailed above but in the presence of a sample tissue matrix. Variable amounts of the NRCC-TORT-2 certified reference material, which has low CH_3Hg contents ($152 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, 0.4 g, 2g, 3 g), were spiked with different concentrations of the in-house CH_3Hg standard solution (CH_3Hg ranging from 20 to 40 μg). As indicated in Table 3, no matrix effects were observed on CH_3Hg recovery (92 to 108%) during the combined SEM, halogenation and pre-concentration steps. Methylmercury $\delta^{13}\text{C}$ CSIA performed for the different spike conditions yield a $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ mean values of $-54.4 \pm 0.4\text{‰}$, 2SD, n=13. This is not statistically different from the consensus mean value established ($-53.8 \pm 1.1\text{‰}$, $\pm 2\text{SD}$, n=98) for the same CH_3Hg standard solution in the absence of tissue matrix.

Chapitre 8. Détermination du $\delta^{13}\text{C}$ sur la molécule de méthylmercure par chromatographie gazeuse-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS)

Table 3: Synthesis of the $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ measurements obtained by applying the SEM to the CH_3Hg reference standard solution, to a low concentration biological CRM (TORT-2, NRCC) spiked with different amounts of the same CH_3Hg solution to investigate the influence of matrix effects, and to a biological CRM (ERM-CE464 tuna fish) showing suitable CH_3Hg levels to be measured by the GC-C-IRMS method.

Biological Reference Material* (Sample Mass Extracted (g))	CH_3Hg Reference Std. Sol. ($5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (Spike Amount (g))	SEM Replicates** (n)	SEM CH_3Hg Recovery (%)***	Amount of Carbon injected (ng.C) (ng. CH_3Hg)	Peak Area	Sensitivity (ng^{-1}C injected)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ $\pm 2\text{SD}$ (‰)****
-	4 g	3	98%	17.1 (306)	2.13	0.12	-53.8 \pm 0.4
TORT-2 3 g	4 g	1	95%	21.1 (378)	2.52	0.12	-54.4 \pm 0.4
TORT-2 2 g	8 g	1	92%	43.7 (783)	5.04	0.12	-54.5 \pm 0.3
TORT-2 0.4 g	4 g	1	108%	21.8 (391)	2.95	0.14	-54.2 \pm 0.4
ERM-CE464 4g	-	4	96%	14.7 (253)	2.24	0.12	-22.1 \pm 1.5

* TORT-2: $0.152 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ CH_3Hg certified concentration, ERM-CE464: $5.15 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ CH_3Hg certified concentration

** Number of independent SEM extraction performed

*** Determined by external calibration based on a direct CH_3HgI standard calibration curve (non-processed by the SEM)

**** Average values are based on the triplicate injection of each SEM replicate

Establishing preliminary $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ reference values to ERM-CE464 Tuna fish material

The ERM-CE464 tuna fish reference material was prepared in 1989 from 322kg of fresh dorsal muscle from multiple individuals from the Adriatic basin of the Mediterranean Sea. Although the IRMM does not report the biological species, it is most likely Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). *T. thynnus* spawns in the western mediterranean where it was caught, but is most likely exposed to CH_3Hg across the Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. ERM-CE464 is characterized by high CH_3Hg contents ($5.50\pm 0.17 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ as CH_3Hg), and ideal for applying the SEM-halogenation method for providing the first $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ values in a marine biological tissue. We prepared and analyzed ERM-CE464 in the same way (similar CH_3Hg quantity) as the in-house CH_3Hg reference solution and TORT-2 spiking experiments (Table 3). A peak area of 2.24 V was measured for 14.65 $\text{ngC}_{\text{injected}}$, suggesting quantitative extraction and injection of CH_3Hg (96%) in the GC-C-IRMS, but also the absence of chromatographic interferences. A $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ value of $-22.1\pm 1.2\%$ ($\pm 2\text{SD}$, $n=20$ injections) was obtained on 4 independent SEM-halogenation extractions of 4 g of ERM-CE464.

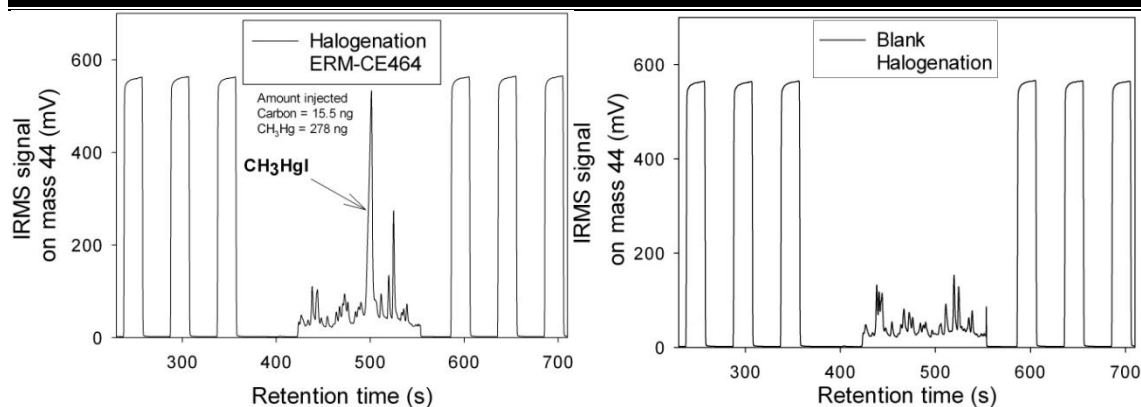


Figure 4: Typical chromatogram obtained for the analysis of $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ for ERM-CE464 Tuna fish material by GC-C-IRMS. A chromatogram of the blank method is also illustrated in the upper right end corner, with most of the carbon blank contribution originating from the solvent once evaporated and injected. No detectable peaks were measured on the blank sample at the retention time of CH_3HgI .

Conclusion

In this work, we tested three derivatization techniques (propylation, ethylation and halogenation) to determine $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic ratios of the carbon atom present in the methyl group of the CH_3Hg compound in a commercial CH_3Hg salt and in the ERM-CE464 tuna fish certified reference material. A $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ value of $-53.8 \pm 1.1\%$ ($\pm 2\text{SD}$, $n=73$ injections) was established for the in-house CH_3Hg standard solution by the three independent derivitization methods. The halogenation method was shown to yield the highest precision. Following our previously developed CH_3Hg selective extraction method (SEM), we further show that the CH_3Hg SEM is not only relevant for Hg-CSIA but also now for C-CSIA of CH_3Hg in biological samples (Masbou et al., 2013). We find a $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ value of $-22.1 \pm 1.2\%$ ($\pm 2\text{SD}$) for the tuna fish ERM-CE464 certified reference material. The tuna fish CH_3Hg $\delta^{13}\text{C}$ value is similar to marine phytoplankton $\delta^{13}\text{C}$ of -21% and dissimilar to coastal sediment $\delta^{13}\text{C}$ of -25% in the Adriatic Sea. We previously found Hg-CSIA derived $\delta^{202}\text{Hg}$ and $\Delta^{199}\text{Hg}$ signatures of $0.62 \pm 0.11\%$ and $2.34 \pm 0.11\%$ for ERM-CE464 (Masbou et al., 2013). These Hg isotope signatures are compatible with in situ water column production, and surface ocean photochemical breakdown of CH_3Hg of suggested by Blum et al., (2013) for Pacific fish, including tuna. Our combined C and Hg CSIA of the CH_3Hg molecule in ERM-CE464 strongly suggest that CH_3Hg is indeed produced in the open ocean environment, and not in coastal sediments.

Acknowledgments

This work is supported by the CNRS MI « Instrumentation aux limites » Project 2D ORGANOMETAL grant and the Observatoire Midi Pyrénées (OMP) internal stable isotope funding to DP. JM is grateful to the “Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche” for his Doctoral Fellowship (Ecole Doctorale ED SDU2E/UPS). A. Baya is thanked for technical assistance on the CH_3Hg sample preparation and extraction; B. Lebreton is thanked for the bulk $\delta^{13}\text{C}$ determinations on IRMM ERM CE 464.

Bibliography

- Becker, P.R. et al., 2000. Concentrations of Polychlorinated Biphenyls (PCB's), Chlorinated Pesticides, and Heavy Metals and Other Elements in Tissues of Belugas, *Delphinapterus leucas*, from Cook Inlet. *Marine Fisheries Review*, 62(3): p. 81-98.
- Benoit, J.M., Gilmour, C.C., Mason, R.P., 2001. Aspects of Bioavailability of Mercury for Methylation in Pure Cultures of *Desulfobulbus propionicus* (1pr3). *Applied and environmental microbiology*, 67(1): 51-58.
- Bergquist, B.A., Blum, J.D., 2007. Mass-Dependent and -Independent Fractionation of Hg Isotopes by Photoreduction in Aquatic Systems. *Science*, 318(5849): 417-420.
- Bloom, N., Fitzgerald, W.F., 1988. Determination of volatile mercury species at the picogram level by low-temperature gas chromatography with cold-vapour atomic fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 208: 151-161.
- Choi, A.L., Grandjean, P., 2008. Methylmercury exposure and health effects in humans. *Environmental Chemistry*, 5(2): 112-120.
- Clough, R., Harrington, C.F., Hill, S.J., Madrid, Y., Tyson, J.F., 2013. Atomic spectrometry update. Elemental speciation review. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 28(8): 1153-1195.
- Compeau, G., Bartha, R., 1985. Sulfate-reducing bacteria: principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment. *Applied and environmental microbiology*, 50(2): 498-502.
- Cossa, D. et al., 2011. Mercury in the Southern Ocean. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75(14): 4037-4052.
- Das, R., Bizimis, M., Wilson, A.M., 2013. Tracing mercury seawater vs. atmospheric inputs in a pristine SE USA salt marsh system: Mercury isotope evidence. *Chemical Geology*, 336(0): 50-61.
- Das, R., Salters, V.J.M., Odom, A.L., 2009. A case for in vivo mass-independent fractionation of mercury isotopes in fish. *Geochem. Geophys. Geosyst.*, 10(11): Q11012.
- Day, R.D. et al., 2012. Mercury Stable Isotopes in Seabird Eggs Reflect a Gradient from Terrestrial Geogenic to Oceanic Mercury Reservoirs. *Environmental Science & Technology*, 46(10): 5327-5335.
- Epov, V.N. et al., 2008. Simultaneous Determination of Species-Specific Isotopic Composition of Hg by Gas Chromatography Coupled to Multicollector ICPMS. *Analytical Chemistry*, 80(10): 3530-3538.
- Gantner, N., Hintelmann, H., Zheng, W., Muir, D.C., 2009. Variations in Stable Isotope Fractionation of Hg in Food Webs of Arctic Lakes. *Environmental Science & Technology*, 43(24): 9148-9154.

- Heimbürger, L.-E. et al., 2010. Methyl mercury distributions in relation to the presence of nano- and picophytoplankton in an oceanic water column (Ligurian Sea, North-western Mediterranean). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74(19): 5549-5559.
- Hintelmann, H., Evans, R.D., Villeneuve, J.Y., 1995. Measurement of mercury methylation in sediments by using enriched stable mercury isotopes combined with methylmercury determination by gas chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 10(9): 619-624.
- Masbou, J., Point, D., Sonke, J.E., 2013. Application of a selective extraction method for methylmercury compound specific stable isotope analysis (MeHg-CSIA) in biological materials. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*.
- Mason, R.P., 2013. Trace Metals in Aquatic Systems. Wiley. com.
- Mason, R.P., Fitzgerald, W., 1993. The distribution and biogeochemical cycling of mercury in the equatorial Pacific Ocean. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 40(9): 1897-1924.
- Mason, R.P., Reinfelder, J.R., Morel, F.M.M., 1995. Bioaccumulation of mercury and methylmercury. *Water, Air, and Soil Pollution*, 80(1-4): 915-921.
- Mason, R.P., Reinfelder, J.R., Morel, F.M.M., 1996. Uptake, Toxicity, and Trophic Transfer of Mercury in a Coastal Diatom. *Environmental Science & Technology*, 30(6): 1835-1845.
- Monperrus, M. et al., 2007. Mercury methylation, demethylation and reduction rates in coastal and marine surface waters of the Mediterranean Sea. *Marine Chemistry*, 107(1): 49-63.
- Perrot, V. et al., 2010. Tracing Sources and Bioaccumulation of Mercury in Fish of Lake Baikal–Angara River Using Hg Isotopic Composition. *Environmental Science & Technology*, 44(21): 8030-8037.
- Point, D. et al., 2008. Consideration and influence of complexed forms of mercury species on the reactivity patterns determined by speciated isotope dilution model approaches: A case for natural biological reference materials. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23(3): 385-396.
- Point, D. et al., 2011. Methylmercury photodegradation influenced by sea-ice cover in Arctic marine ecosystems. *Nature Geosci*, 4(3): 188-194.
- Ranchou-Peyruse, M. et al., 2009. Overview of Mercury Methylation Capacities among Anaerobic Bacteria Including Representatives of the Sulphate-Reducers: Implications for Environmental Studies. *Geomicrobiology Journal*, 26(1): 1-8.
- Senn, D.B. et al., 2010. Stable Isotope (N, C, Hg) Study of Methylmercury Sources and Trophic Transfer in the Northern Gulf of Mexico. *Environmental Science & Technology*, 44(5): 1630-1637.
- St. Louis, V.L. et al., 2011. Differences in Mercury Bioaccumulation between Polar Bears (*Ursus maritimus*) from the Canadian high- and sub-Arctic. *Environmental Science & Technology*, 45(14): 5922-5928.
- Sunderland et al., 2009. Mercury sources, distribution, and bioavailability in the North Pacific Ocean: Insights from data and models, 23. American Geophysical Union, Washington, DC, ETATS-UNIS.
- Sunderland, E.M., Mason, R.P., 2007. Human impacts on open ocean mercury concentrations. *Global biogeochemical cycles*, 21(4).
- Trasande, L., Landrigan, P.J., Schechter, C., 2005. Public health and economic consequences of methyl mercury toxicity to the developing brain. *Environmental health perspectives*, 113(5): 590.
- Uthe, J.F., Solomon, J., Grift, B., 1972. Rapid semimicro method for the determination of methyl mercury in fish tissue. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 55(3): 583-589.

Chapitre 8. Détermination du $\delta^{13}\text{C}$ sur la molécule de méthylmercure par chromatographie gazeuse-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS)

- Wagemann et al., 1997. Percent methylmercury and organic mercury in tissues of marine mammals and fish using different experimental and calculation methods, 16. SETAC, Pensacola, FL, ETATS-UNIS.
- Yin, R., Feng, X., Shi, W., 2010. Application of the stable-isotope system to the study of sources and fate of Hg in the environment: A review. *Applied Geochemistry*, 25(10): 1467-1477.

Supporting information

Methylmercury $\delta^{13}\text{C}$ compound specific stable isotope analysis by gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry

*J. Masbou¹, D. Point^{*1}, G. Guillou², J.E. Sonke, P. Richard²*

¹Observatoire Midi-Pyrénées, Laboratoire Géosciences Environnement Toulouse, CNRS/IRD/Université Paul Sabatier Toulouse 3, 14 avenue Edouard Belin, 31400 Toulouse, France.

²UMR Littoral, Environnement et Sociétés (LIENSs), UMR 6250 CNRS-Université de La Rochelle, Institut du Littoral et de l'Environnement, 2 rue Olympe de Gouges, 17000 La Rochelle, France.

RECEIVED DATE

*Author for correspondence: david.point@ird.fr

Chapitre 8. Détermination du $\delta^{13}\text{C}$ sur la molécule de méthylmercure par chromatographie gazeuse-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS)

Table S1: Instrumental conditions for GC-HR-ICP-MS

GC parameters		
	Derivatization	Halogenation
Column	Agilent DB-5 (30m, 0.25 mm I.D., 0.25 μm)	Restek RTX-5 (30m, 0.25 mm I.D., 0.1 μm)
GC Program	Initial temp: 40°C Hold Time: 1 min Ramp: 35°C/min - 250°C Hold Time: 2 min	Initial temp: 60°C Hold Time: 1min Ramp: 30°C/min - 250°C Hold Time: 2 min
Carrier gaz (He) Make-up gas (Ar)	0.7 mL/min 0.7 L.min ⁻¹	1.4 mL/min 0.7 L.min ⁻¹
Injector Set Up	250°C PTV Splitless 1.0 mm ID PTV Liner Injection volume: 1 μl	250°C PTV Splitless 1.0 mm ID PTV Liner Injection volume: 1 μl
<u>Transfer Line:</u> Temperature Length	250°C 0.5 m	
HR-ICP-MS parameters		
	Derivatization	Halogenation
Set Up	Element XR HR-ICP-MS (Thermo Scientific, Bremen, Germany)	
Rf Power	1200W	
<u>Gas flow:</u> Cool	16 L.min ⁻¹	
Auxiliary	0.8 L.min ⁻¹	
Nebulizer	0.45 L.min ⁻¹	
Isotopes/dwell times	Hg : 196, 198, 199, 200, 201, 202, 204 (40ms) Tl : 203, 205 (30ms)	

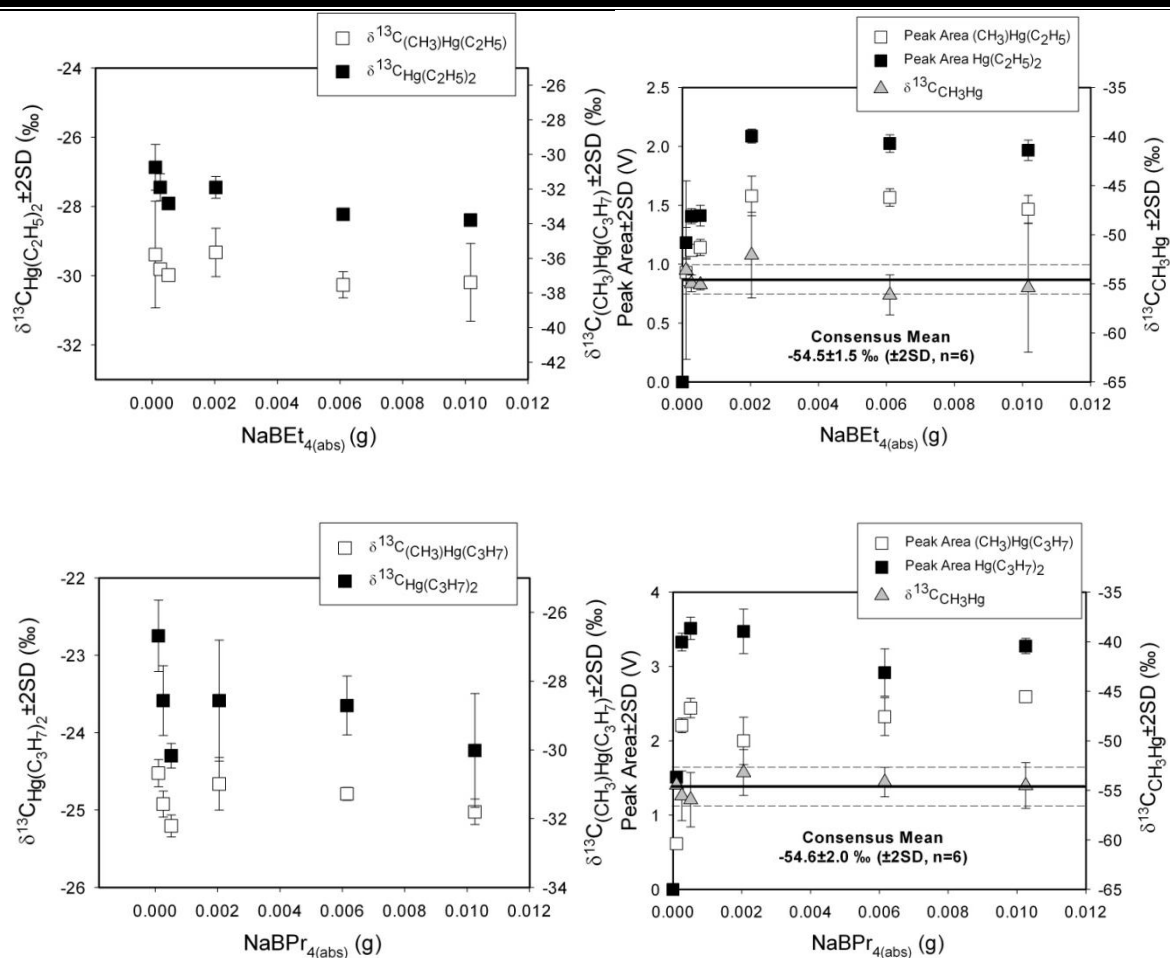


Figure S1: Influence of the concentration and type of derivatizing agent (NaBEt₄ and NaBPr₄) in solution on the derivatization efficiency of $\text{CH}_3\text{Hg}(\text{C}_2\text{H}_5)$, $\text{Hg}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$, $\text{CH}_3\text{Hg}(\text{C}_3\text{H}_7)$, $\text{Hg}(\text{C}_3\text{H}_7)_2$, the corresponding $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ values and the calculated $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ signature (see method section for correction equation). Absolute amounts of derivatization agent have been determined by $\text{NaBPr}_4(\text{Abs}) (\text{g}) = [\text{NaBPr}_4] (\text{g/mL}) \times \text{Volume added (mL)}$. Identical initial conditions were kept for both experiments with the derivatization of 28 μg of CH_3Hg (1.6 μg of carbon) and 20 μg of iHg .

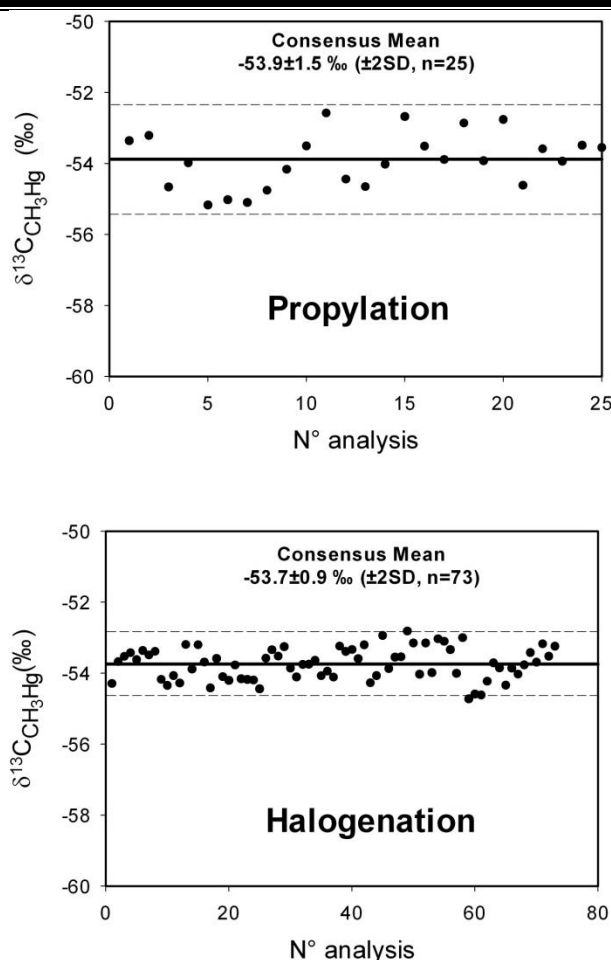


Figure S2: Long term $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ measurements reproducibility for propylation (top) and halogenation conditions (down).

Influence of solvent type on halogenation reaction

A calibration curve has been made using various CH_3Hg standard solutions of 0.1 to 0.5 $\mu\text{g}_{\text{CH}_3\text{Hg}}\cdot\text{g}^{-1}$ prepared in sodium thiosulfate 5 mM. A constant volume (1.5 mL) of this solution was mixed to 0.5 mL of KI (3 mol.L⁻¹) and 10 mL of hexane or iso-octane following halogenation procedures (see previous part). Hexane phases were then analyzed by GC-HR-ICPMS under conditions described in ESI_Table 1. The two calibration curves have been determined by plotting the peak area vs. amount of CH_3Hg injected (ESI_Figure 3). They reveal significantly different linear fits. Slopes of $3.20 \pm 0.30 \cdot 10^8$ Cps/ng $_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ and $0.95 \pm 0.05 \cdot 10^8$ Cps/ng $_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ (2SE) has been found for CH_3Hg halogenation in iso-octane and hexane respectively. These contrasted slopes reveal an important influence of solvent nature on halogenation efficiency. The use of iso-octane as organic phase shows a three-fold improvement in CH_3Hg extraction from the thiosulfate aqueous phase. The similar slope obtained in propylation experiments (slope= $3.51 \pm 0.68 \cdot 10^8$ Cps/ng $_{\text{CH}_3\text{Hg}}$, $\pm\text{SE}$) confirms the entire transfer of CH_3Hg into the iso-octane phase. This statement was checked by performing a

second halogenation on the remaining aqueous phase. No CH_3Hg peak was detected by GC-HR-ICPMS. For those reasons we assume that quantitative transfer of CH_3HgI to the organic phase occurs in iso-octane, considering the reactive conditions describe previously.

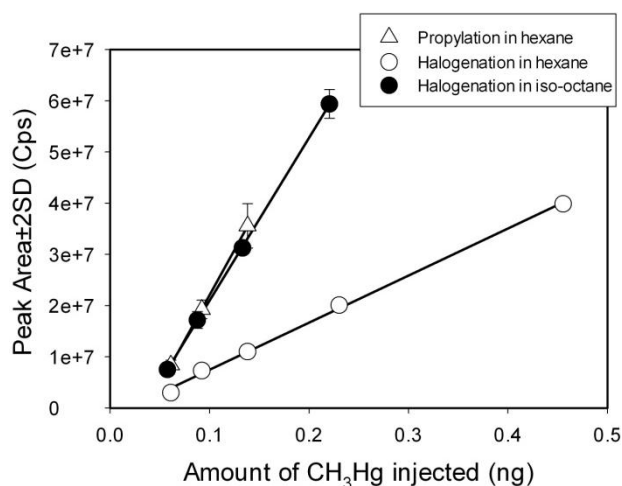


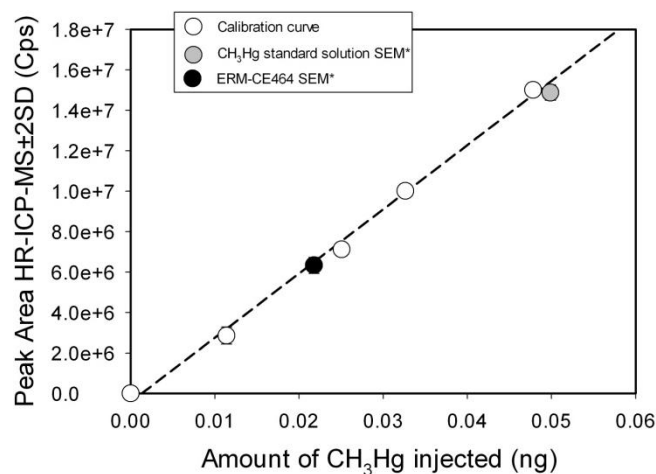
Figure S3: Comparison of peak area vs amount of CH_3Hg injected in GC-HR-ICPMS after CH_3Hg (standard solution) propylation in hexane and halogenation in hexane and iso-octane.

ERM-CE464 recovery check

Our previously developed CH_3Hg SEM has shown the ability to handle up to 1g of biological material (Masbou et al., 2013). Verification of quantitative CH_3Hg extraction for 1g to 4g of ERM-CE464 was verified by GC-HR-ICP-MS. Briefly, a calibration curve has been made using various CH_3Hg standard solutions from 0.01 to 0.05 $\mu\text{g}_{\text{CH}_3\text{Hg}}\cdot\text{g}^{-1}$ prepared in sodium thiosulfate 5mM. Typical halogenation conditions (Experimental Section) have been applied and the amount of carbon injected ranges 0 to 0.05 ng. The same process has been applied to the recovered thiosulfate phase from CH_3Hg SEM on 1 to 4g of ERM-CE464. Results are displayed in ESI_Table 2 and ESI_Figure 4.

Table S2: CH_3Hg recoveries obtained after SEM performed on 1 to 4 g of ERM-CE464.

Mass of material for SEM (g)	Derivatization/Halogenation	Analytical technique	Recovery \pm SD (%)	Ref
0.25	Propylation	ID-GC-HR-ICPMS	98 \pm 3	(Masbou et al., 2013)
1	Halogenation	GC-HR-ICPMS	105 \pm 16	This study
4	Halogenation	GC-HR-ICPMS	97 \pm 12	This study



*Amount of CH₃Hg injected is determined with the theoretical initial CH₃Hg concentration (calculated or certified for CH₃Hg standard solution and ERM-CE464 respectively).

Figure S4: Calibration curve obtained by GC-HR-ICPMS measurements of the halogenated compound CH₃HgI. Calibration curve have been made by halogenation of various CH₃Hg standard solution concentrations in typical reagent and solvent conditions (See Experimental section). Results of the SEM performed on CH₃Hg standard solutions (4g, CH₃Hg=5200 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) and ERM-CE464 (4g, CH₃Hg=5500 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) have been added to the plot.

Bibliography

Masbou, J., Point, D., Sonke, J.E., 2013. Application of a selective extraction method for methylmercury compound specific stable isotope analysis (MeHg-CSIA) in biological materials. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*.

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives

Faisant suite à l'étude de notre groupe sur l'étude des isotopes du Hg dans les œufs de guillemots, des mesures des isotopes du Hg ont été réalisées sur des espèces complémentaires de mammifères marins et sont présentés dans les Chapitres 4 et 5. Via l'analyse de foies de phoques annelés (*Phoca hispida*), le Chapitre 4 confirme l'influence de la spéciation du MMHg pour expliquer les variations de MDF ($\delta^{202}\text{Hg}$) et montre une tendance temporelle significative qui suggère une augmentation du MIF ($\Delta^{199}\text{Hg}$) de 4% par an en moyenne entre 1988 à 2002. En comparant les données d'isotopes du Hg obtenues dans les trois espèces de bioindicateurs considérés (*Phoca hispida*, *Delphinapterus leucas*, *Ursus maritimus*), le Chapitre 5 montre des faibles variations $\Delta^{199}\text{Hg}$ entre les espèces prélevées dans la même zone. Le gradient latitudinal de MIF observé au niveau des œufs de guillemots est confirmé par les données obtenues chez les belugas, phoques annelés et ours polaires ce qui suggère un facteur forçant d'origine géochimique et qui opère à l'interface entre l'océan Pacifique Nord et l'océan Arctique.

Grâce à une analyse spécifique de la couverture de glace intégrée suivant l'habitat des phoques annelés combinée à un modèle d'exposition combinant l'âge des phoques et la spéciation du Hg dans leur foie, nous suggérons que la fonte progressive de la banquise entre 1988 et 2002 est probablement à l'origine de la tendance temporelle de MIF observée. De façon similaire, la différence de couverture de glace entre le nord et le sud de l'Alaska est suspectée être à l'origine du gradient latitudinal de MIF observé quel que soit le bioindicateur choisi (guillemot, baleine beluga). Nous faisons l'hypothèse que la couverture de glace bloque la pénétration des rayons lumineux solaires et les transferts océan-atmosphère de Hg^0 . Ainsi l'activité photochimique à l'origine de la production des anomalies est largement réduite en présence de glace. Un schéma simplifié est présenté en Figure 41, il résume le scénario proposé pour expliquer les tendances temporelles et géographiques observés dans les différentes chaînes trophiques Arctiques et sub Arctiques étudiées.

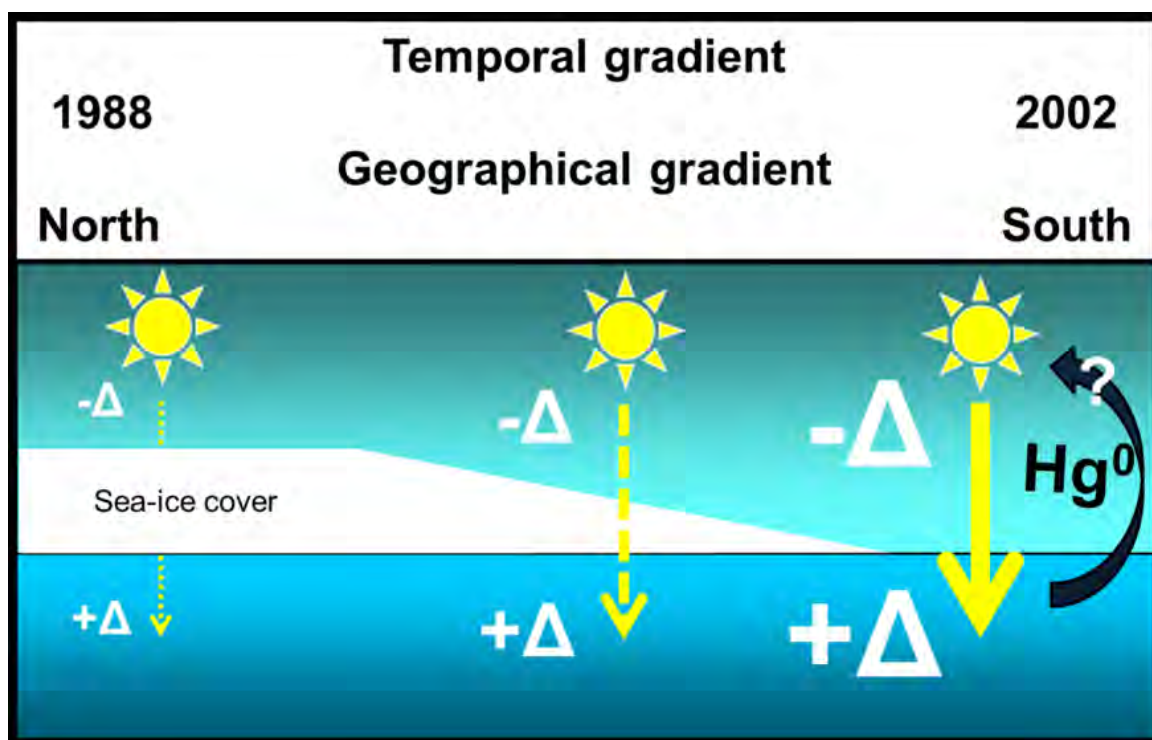


Figure 41 : Schéma simplifié de l'influence de la couverture de glace sur l'activité photochimique du Hg et la production d'anomalie $\Delta^{199}Hg$.

La principale conclusion de ces deux Chapitres est la confirmation de l'influence de la couverture de glace sur le MIF mesuré dans la chaîne trophique. Ces résultats montrent la pertinence de l'utilisation de bioindicateurs pour comprendre et détecter des modifications dans le cycle du Hg et permettent de répondre de façon favorable à la question initiale : « L'utilisation de bioindicateurs pour l'analyse des isotopes du Hg permet-elle une meilleure compréhension du cycle du Hg en Arctique ? ». Cependant, les perspectives à ces travaux sont nombreuses. La première serait la poursuite des analyses en continu des signatures isotopiques du Hg chez les phoques sur des échantillons plus récents. Si cette tendance se confirme, une quantification du flux de Hg de l'océan vers l'atmosphère via photo-réduction à l'origine du MIF observé pourrait être envisagée et justifierait l'utilisation des isotopes du Hg comme traceur de flux. Une première estimation de ce flux a été effectuée spécifiquement pour une présentation orale réalisée en 2012 à la Goldschmidt de Montréal (Masbou et al., 2012). Nous avons estimé à $7 \pm 4\%$ l'augmentation probable du flux de photo-réduction du Hg inorganique entre 1988 et 2002. Cependant, ces calculs sont effectués avec l'utilisation de facteurs de fractionnements photochimiques déterminés dans l'eau douce (Bergquist and Blum, 2007; Zheng and Hintelmann, 2009) et il est probable qu'ils diffèrent dans des matrices de type eau de mer. Une étude expérimentale dans ces conditions est indispensable et très attendue par la communauté scientifique des isotopistes du Hg pour améliorer notre interprétation.

Concernant l'étude des isotopes du Hg dans différentes espèces de bioindicateurs (Chapitre 5), une analyse spécifique de la couverture de glace de l'habitat des belugas serait intéressante, mais les résultats attendus seraient sensiblement les mêmes que ceux obtenus par Point et al (2011). L'intérêt supplémentaire de l'analyse d'échantillons de mammifères pourrait se situer dans l'étude des réactions métaboliques de détoxification et d'excrétion du Hg. En effet, lors de l'interprétation des résultats isotopiques sur la fraction totale du Hg, nous nous sommes rapidement confrontés au problème de la variabilité de la spéciation du Hg dans les échantillons de foies étudiés ($2\% < \text{MMHg} < 39\%$, phoques annelés). Il serait judicieux de pratiquer la méthode SEM sur ces échantillons pour déterminer la composition isotopique du Hg inorganique et MMHg, de façon très précise. D'autre part il faudrait combiner cette étude à une exploration isotopique des réseaux trophiques marins de l'Arctique (premiers maillons trophiques, zooplancton) et des sources de MMHg dans les sédiments et dans la colonne d'eau pour mieux comprendre la dynamique du MMHg en Arctique. L'analyse complémentaire du $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ sur ces mêmes échantillons devrait permettre de mieux comprendre si la dynamique de changement climatique influence aussi les sources ou les rendements de méthylation du Hg.

A l'interface entre l'étude environnementale et les développements analytiques, le Chapitre 6 (réalisé avec la collaboration de Vincent Perrot) présente les premières données de Hg-CSIA par GC-MC-ICPMS sur de nombreux échantillons biologiques. Nous montrons que l'analyse en Hg-CSIA de tissus biologiques d'organismes supérieurs peut fournir des informations sur l'influence du métabolisme sur la distribution *in-vivo* du Hg. La signature isotopique $\delta^{202}\text{HgT}$ dans différents tissus/organes de phoques et de belugas est surtout tributaire de la spéciation du Hg. Nous avons montré que les espèces de Hg (Hg inorganique et MMHg) ont des signatures isotopiques en $\delta^{202}\text{Hg}$ différentes. L'entrée dans l'organisme du Hg se faisant essentiellement sous forme de MMHg, nous suggérons que la déméthylation hépatique du MMHg chez les mammifères est le processus principal générateur des variations de MDF observés dans les autres tissus. Au contraire, nous n'avons pas détecté de différences entre les signatures isotopiques $\Delta^{199}\text{Hg}$ du MMHg et du Hg inorganique. Ces résultats confirment que la production de Hg MIF est peu probable *in vivo*, en accord avec les observations de fractionnements isotopiques biotiques (Kritee et al., 2013; Kwon et al., 2012). Les processus photochimiques sont ainsi toujours les principaux mécanismes considérés pour expliquer la variabilité du MIF observé dans l'environnement.

La mesure des isotopes du Hg sur les différentes espèces chimiques a donc été initiée par Epov et al. en 2008 avec l'utilisation de la chromatographie gazeuse couplée « on line » à un MC-ICPMS (GC-MC-ICPMS) [245]. Nous montrons dans le Chapitre 7 une technique alternative « off-line » basée sur une extraction physico-chimique et sélective du MMHg (SEM) pour les échantillons biologiques. L'analyse de signaux continus permet une amélioration très significative de la précision sur le $\delta^{202}\text{Hg}$ d'environ 3-4 fois ($\approx 0.1\%$, 2SD) par rapport aux signaux transitoires générés par GC-

MC-ICPMS ($\approx 0.35\%$). À travers l'exploration de la signature isotopique la plus précise possible en Hg de MMHg dans les échantillons biologiques, plusieurs nouvelles pistes apparaissent pour comprendre la dynamique biogéochimique du Hg. La capacité de pré-concentration et la robustesse vis-à-vis de la matrice de la méthode SEM permet d'étudier la signature isotopique du MMHg chez les organismes de faible niveau trophique comme le plancton. La source de MMHg à la base de la chaîne alimentaire ainsi que la dynamique biogéochimique et photochimique du MMHg peut ainsi être étudiée. De plus, la variabilité importante de la spéciation du Hg dans les différents tissus fait que l'analyse isotopique sur la fraction totale n'est plus suffisante aujourd'hui et que des approches moléculaires semblent essentielles. Utilisant la technique de SEM développée pour l'analyse isotopique du Hg sur la molécule de MMHg, le chapitre 8 présente les premières mesures de composition isotopique du C sur la molécule de MMHg par GC-IRMS. Une première valeur de référence sur un échantillon de thon certifié (IRMM-ERM-CE464) a pu être déterminée ($\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}} = -22.1 \pm 1.2\%$ (2SD, n=20)). S'ajoutant à la signature $\delta^{202}\text{Hg}_{\text{CH}_3\text{Hg}} = 0.62 \pm 0.13\%$ (2SD, n=6) et $\Delta^{199}\text{Hg}_{\text{CH}_3\text{Hg}} = 1.82 \pm 0.06\%$ (2SD, n=6) mesurée dans le Chapitre 7, cette étude ouvre la voie à la double caractérisation isotopique du Hg et du C au niveau moléculaire sur la molécule de MMHg. Nous considérons ce nouvel outil comme très prometteur pour comprendre l'origine de la formation du MMHg dans la colonne d'eau et tracer de façon simultanée les sources de Hg et de C qui contribuent à sa formation.

Plusieurs perspectives émergent de ces deux derniers chapitres de thèse. Premièrement, plusieurs améliorations peuvent être apportées à la méthode SEM. Alors que la détermination de la signature isotopique du MMHg est une mesure directe très précise (2SD $\approx 0.1\%$), celle du Hg inorganique est indirecte et obtenue par différence au niveau du bilan de masse générant par propagation d'erreurs des incertitudes plus importantes (2SD $\approx 0.3\%$) et comparables à celles rencontrées en GC-MC-ICPMS. Un développement de la méthode SEM pour mesurer de façon directe la composition du mercure inorganique pourrait se faire en récupérant la phase aqueuse contenant le Hg inorganique dans la première étape (extraction de MMHgBr dans toluène) et en effectuant une digestion de celle-ci par μ -ondes par exemple, avant analyse par CV-MC-ICPMS. Ensuite la méthode SEM est, telle qu'elle est présentée, spécifiquement destinée aux échantillons biologiques, limitant pour le moment son application à d'autres matrices. Une publication de Maggi et al. (2009) propose une variante de la méthode SEM qui pourrait être modifiée pour l'analyse des concentrations en MMHg dans les sédiments (Maggi et al., 2009). Cette méthode une fois modifiée pourrait être en théorie applicable pour réaliser des mesures de composition isotopique du Hg à l'échelle moléculaire sur des matrices sédimentaires. Enfin, avec une mise en œuvre beaucoup plus simple que le couplage GC-MC-ICPMS, et permettant des mesures significativement plus précises, l'application de la méthode SEM devrait permettre l'analyse isotopique du Hg à l'échelle moléculaire sur des échantillons de chaîne trophique contrastés. Ainsi, parallèlement à cette thèse, environ 100 échantillons provenant des chaînes trophiques du lac Titicaca et Uru Uru en Bolivie (Plancton, plantes, muscles de poissons et

tissus d'oiseaux) ont été analysés en Hg-CSIA (non présentés ici). Avec le suivi spécifique de la signature isotopique du MMHg, les conditions d'observation des processus de bio-amplification devraient nettement s'améliorer avec des avancées notables attendues, en particulier au niveau de l'étude des processus de transferts et d'accumulation dans les premiers maillons de la chaîne trophique.

Les perspectives de mesure de la signature isotopique du carbone par la méthode SEM et l'analyse par GC-IRMS offre de nouvelles perspectives pour comprendre le cycle du Hg. Alors que le lien entre le cycle du carbone et celui du Hg est implicite notamment lors des processus de méthylation (Ullrich et al., 2001), de déméthylation (Zheng and Hintelmann, 2009) ou de bio-accessibilité du Hg (Barkay et al., 1997), l'analyse simultanée des isotopes du mercure et du carbone révèle un fort potentiel pour concrètement étudier quelles sources de carbone et de mercure contribuent à la formation du MMHg. Alors que la réponse à la question majeure qui concerne l'origine de la méthylation reste encore en suspens, la possibilité d'explorer à l'échelle isotopique l'atome de carbone contenu dans la molécule de MMHg pourrait représenter une nouvelle voie de recherche. Les premières données présentées dans le Chapitre 8 concernent uniquement une solution synthétique et un échantillon certifié de thons, des analyses plus complètes devraient être effectuées sur d'autres échantillons. Pour le moment, seuls des échantillons très concentrés en MMHg ($>5 \text{ mg.kg}^{-1}$) et disponibles en quantité suffisamment importantes (>4 grammes) peuvent prétendre à une mesure précise de $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$. Quelques prédateurs terminaux comme certaines espèces de thons, d'espadons, ou des mammifères marins présentent des teneurs en MMHg suffisantes. Cependant, il existe de nombreuses autres possibilités pour améliorer la sensibilité de mesure, en particulier, l'utilisation d'un spectromètre de masse IRMS plus de type DELTA V™ Plus, ou MAT 253 (Thermo Scientific) pourrait être judicieux. Un autre aspect d'amélioration concerne l'étape de préconcentration par évaporation. En effet, malgré la pureté maximale des solvants utilisés ($>99.8\%$) une détérioration significative de la ligne de base est observée pour les facteurs de préconcentration important (≈ 200). L'augmentation du bruit de fond de la ligne base engendre une moins bonne précision de mesure que dans le cas d'échantillons peu évaporés, ou plus concentrés. Une alternative à cette étape devrait être envisagée. Un résumé de la partie purement analytique de la thèse est présenté dans la Figure 42.

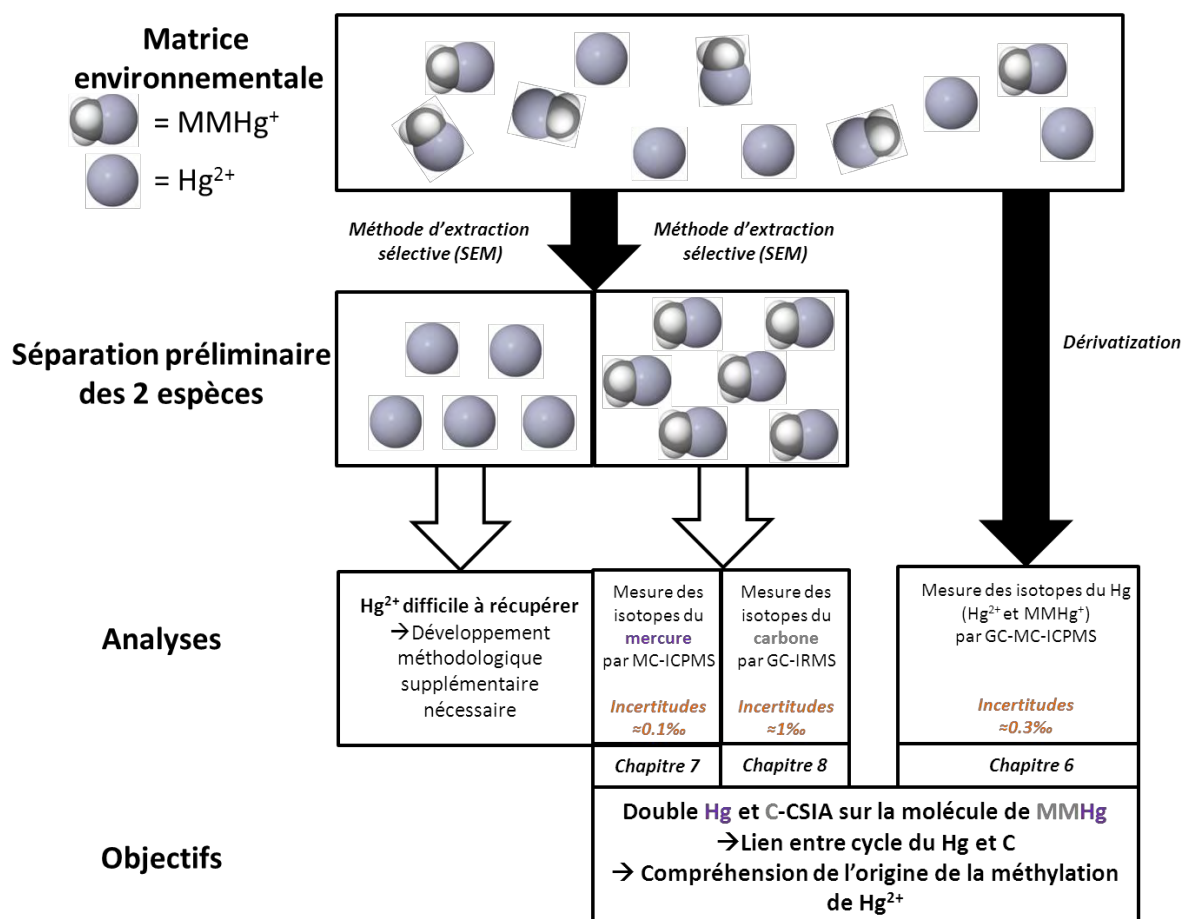


Figure 42 : Résumé des développements analytiques effectués durant la thèse. La partie analytique du Chapitre 6 a été effectuée par Vincent Perrot au LCABIE à Pau.

Références bibliographiques

- (UNEP), U.N.E.P., 2002. Global Mercury Assessment. UNEP Chemicals Mercury Programme, Available at: www.chem.unep.ch/mercury/Report/Final%20Assessment%20report.htm.
- Achá, D., Hintelmann, H., Yee, J., 2011. Importance of sulfate reducing bacteria in mercury methylation and demethylation in periphyton from Bolivian Amazon region. *Chemosphere*, 82(6): 911-916.
- Albers, J.W. et al., 1988. Neurological abnormalities associated with remote occupational elemental mercury exposure. *Annals of Neurology*, 24(5): 651-659.
- AMAP, 2011. AMAP Assessment 2011: Mercury in the Arctic. Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP), Oslo, Norway, xiv + 193 pp.
- Amos, H.M., Jacob, D.J., Streets, D.G., Sunderland, E.M., 2013. Legacy impacts of all-time anthropogenic emissions on the global mercury cycle. *Global biogeochemical cycles*, 27(2): 410-421.
- Angeli, I., 2004. A consistent set of nuclear rms charge radii: properties of the radius surface R_N (N , Z). *Atomic data and nuclear data tables*, 87(2): 185-206.
- Arago, L., 1980. *Vie et milieu*. Masson.
- Ariya et al., 2004. The Arctic: a sink for mercury, 56. Blackwell, Oxford, Royaume-Uni, 7 pp.
- Ariya, P.A., Khalizov, A., Gidas, A., 2002. Reactions of Gaseous Mercury with Atomic and Molecular Halogens: Kinetics, Product Studies, and Atmospheric Implications. *The Journal of Physical Chemistry A*, 106(32): 7310-7320.
- Ariya, P.A., Skov, H., Grage, M.M.-L., Goodsite, M.E., 2008. Gaseous elemental mercury in the ambient atmosphere: Review of the application of theoretical calculations and experimental studies for determination of reaction coefficients and mechanisms with halogens and other reactants. *Advances in Quantum Chemistry*, 55: 43-55.
- ATSDR, U., 1999. Toxicological profile for mercury. Atlanta: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, US Department of Health and Human Services.
- Atwell, L., Hobson, K.A., Welch, H.E., 1998. Biomagnification and bioaccumulation of mercury in an arctic marine food web: insights from stable nitrogen isotope analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55(5): 1114-1121.
- Aubail, A., Dietz, R., Rigét, F., Simon-Bouhet, B., Caurant, F., 2010. An evaluation of teeth of ringed seals (*Phoca hispida*) from Greenland as a matrix to monitor spatial and temporal trends of mercury and stable isotopes. *Science of The Total Environment*, 408(21): 5137-5146.
- Bakir, F. et al., 1973. Methylmercury poisoning in Iraq. *Science*, 181(96): 230-241.
- Bard, S.M., 1999. Global transport of anthropogenic contaminants and the consequences for the Arctic marine ecosystem. *Marine Pollution Bulletin*, 38(5): 356-379.
- Barkay, T., Gillman, M., Turner, R.R., 1997. Effects of dissolved organic carbon and salinity on bioavailability of mercury. *Applied and environmental microbiology*, 63(11): 4267-4271.
- Barkay, T., Miller, S.M., Summers, A.O., 2003. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS microbiology reviews*, 27(2-3): 355-384.
- Barrie, L., Bottenheim, J., Schnell, R., Crutzen, P., Rasmussen, R., 1988. Ozone destruction and photochemical reactions at polar sunrise in the lower Arctic atmosphere.
- Becker, P.R., Koster, B.J., Wise, S.A., Zeisler, R., 1990. Alaskan marine mammal tissue archival project. *Biol Trace Elem Res*, 26-27: 329-34.

- Becker, P.R. et al., 2000. Concentrations of Polychlorinated Biphenyls (PCB's), Chlorinated Pesticides, and Heavy Metals and Other Elements in Tissues of Belugas, *Delphinapterus leucas*, from Cook Inlet. *Marine Fisheries Review*, 62(3): p. 81-98.
- Becker, P.R., Mackey, E., Schantz, M., Demiralp, R., Greenberg, R., 1995. Concentrations of chlorinated hydrocarbons, heavy metals and other elements in tissues banked by the Alaska Marine Mammal Tissue Archival Project, National Inst. of Standards and Technology (CSTL), Gaithersburg, MD (United States).
- Béland, P., 1996. The beluga whales of the St. Lawrence River. *Scientific American*, 274(5): 74-81.
- Berg, T., Sekkesæter, S., Steinnes, E., Valdal, A.-K., Wibetoe, G., 2003. Springtime depletion of mercury in the European Arctic as observed at Svalbard. *Science of The Total Environment*, 304(1): 43-51.
- Bergquist, B.A., Blum, J.D., 2007. Mass-Dependent and -Independent Fractionation of Hg Isotopes by Photoreduction in Aquatic Systems. *Science*, 318(5849): 417-420.
- Bergquist, B.A., Blum, J.D., 2009. The Odds and Evens of Mercury Isotopes: Applications of Mass-Dependent and Mass-Independent Isotope Fractionation. *Elements*, 5(6): 353-357.
- Berlin, M., Mercury, F.L., Nordberg, G., Vouk, V., 1986. Handbook on the Toxicology of Metals, 1986, 387-445. Elsevier, Amsterdam.
- Bigeleisen, J., 1949. The Relative Reaction Velocities of Isotopic Molecules. *The Journal of Chemical Physics*, 17(8): 675-678.
- Bigeleisen, J., 1996a. Nuclear size and shape effects in chemical reactions. Isotope chemistry of the heavy elements. *Journal of the American Chemical Society*, 118(15): 3676-3680.
- Bigeleisen, J., 1996b. Temperature dependence of the isotope chemistry of the heavy elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(18): 9393-9396.
- Bisogni Jr, J.J., Lawrence, A.W., 1975. Kinetics of mercury methylation in aerobic and anaerobic aquatic environments. *Journal (Water Pollution Control Federation)*: 135-152.
- Biswas, A., Blum, J.D., Bergquist, B.A., Keeler, G.J., Xie, Z., 2008. Natural mercury isotope variation in coal deposits and organic soils. *Environmental Science & Technology*, 42(22): 8303-8309.
- Bloom, N.S., 1992. On the chemical form of mercury in edible fish and marine invertebrate tissue. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49(5): 1010-1017.
- Bluhm, B.A., Gradinger, R., 2008. Regional variability in food availability for Arctic marine mammals. *Ecological Applications*, 18(sp2): S77-S96.
- Blum, J., Bergquist, B., 2007. Reporting of variations in the natural isotopic composition of mercury. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388(2): 353-359.
- Blum, J.D., 2011. Marine chemistry: Marine mercury breakdown. *Nature Geosci*, 4(3): 139-140.
- Blum, J.D., Popp, B.N., Drazen, J.C., Anela Choy, C., Johnson, M.W., 2013a. Methylmercury production below the mixed layer in the North Pacific Ocean. *Nature Geosci*, advance online publication.
- Blum, J.D., Popp, B.N., Drazen, J.C., Choy, C.A., Johnson, M.W., 2013b. Methylmercury production below the mixed layer in the North Pacific Ocean. *Nature geoscience*, 6(10): 879-884.
- Boadi, W.Y., Urbach, J., Brandes, J.M., Yannai, S., 1992. *In vitro* effect of mercury on enzyme activities and its accumulation in the first-trimester human placenta. *Environmental Research*, 57(1): 96-106.
- Bodaly, R., Rudd, J., Fudge, R., Kelly, C., 1993. Mercury concentrations in fish related to size of remote Canadian Shield lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50(5): 980-987.

- Boltwood, B., 1906. Radio-activity of thorium minerals and salts. *American Journal of Science*(126): 415-426.
- Bose-O'Reilly, S., McCarty, K.M., Steckling, N., Lettmeier, B., 2010. Mercury exposure and children's health. *Current problems in pediatric and adolescent health care*, 40(8): 186-215.
- Bossi et al., 2005. Temporal and spatial trends of perfluorinated compounds in ringed seal (*Phoca hispida*) from Greenland, 39. American Chemical Society, Washington, DC, ETATS-UNIS, 7 pp.
- Bridou, R., Monperrus, M., Gonzalez, P.R., Guyoneaud, R., Amouroux, D., 2011. Simultaneous determination of mercury methylation and demethylation capacities of various sulfate-reducing bacteria using species-specific isotopic tracers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(2): 337-344.
- Brönsted, J., Hevesy, G.v., 1920. The separation of the isotopes of mercury. *Nature*, 106: 144.
- Buchachenko, A., Galimov, E., Ershov, V., Nikiforov, G., Pershin, A., 1976. Isotopic enrichment induced by magnetic-interactions in chemical-reactions. *Doklady Akademii Nauk Sssr*, 228(2): 379-381.
- Butler Walker, J. et al., 2006. Maternal and umbilical cord blood levels of mercury, lead, cadmium, and essential trace elements in Arctic Canada. *Environmental Research*, 100(3): 295-318.
- Canário, J., Branco, V., Vale, C., 2007. Seasonal variation of monomethylmercury concentrations in surface sediments of the Tagus Estuary (Portugal). *Environmental Pollution*, 148(1): 380-383.
- Carignan, J., Estrade, N., Sonke, J.E., Donard, O.F., 2009. Odd isotope deficits in atmospheric Hg measured in lichens. *Environmental Science & Technology*, 43(15): 5660-5664.
- Carignan, J., Sonke, J., 2010. The effect of atmospheric mercury depletion events on the net deposition flux around Hudson Bay, Canada. *Atmospheric Environment*, 44(35): 4372-4379.
- Celo, V., Lean, D.R.S., Scott, S.L., 2006. Abiotic methylation of mercury in the aquatic environment. *Science of The Total Environment*, 368(1): 126-137.
- Chen, J., Hintelmann, H., Dimock, B., 2010. Chromatographic pre-concentration of Hg from dilute aqueous solutions for isotopic measurement by MC-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 25(9): 1402-1409.
- Chen, J., Hintelmann, H., Feng, X., Dimock, B., 2012. Unusual fractionation of both odd and even mercury isotopes in precipitation from Peterborough, ON, Canada. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 90(0): 33-46.
- Choi, B.H., Lapham, L.W., Amin-Zaki, L., Saleem, T., 1978. Abnormal neuronal migration, deranged cerebral cortical organization, and diffuse white matter astrocytosis of human fetal brain: a major effect of methylmercury poisoning in utero. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 37(6): 719-733.
- Citta, J.J., Suydam, R.S., Quakenbush, L.T., Frost, K.J., O'Corry-Crowe, G.M., 2013. Dive Behavior of Eastern Chukchi Beluga Whales (*Delphinapterus leucas*), 1998–2008. *Arctic*, 66(4): 389–406.
- Clarkson, T.W., 1997. The toxicology of mercury. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 34(4): 369-403.
- Cleckner, L.B., Gilmour, C.C., Hurley, J.P., Krabbenhoft, D.P., 1999. Mercury methylation in periphyton of the Florida Everglades. *Limnology and Oceanography*, 44(7): 1815-1825.
- Compeau, G., Bartha, R., 1984. Methylation and demethylation of mercury under controlled redox, pH and salinity conditions. *Applied and environmental microbiology*, 48(6): 1203-1207.

- Compeau, G., Bartha, R., 1985. Sulfate-reducing bacteria: principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment. *Applied and environmental microbiology*, 50(2): 498-502.
- Cossa, D., Averty, B., Pirrone, N., 2009. The origin of methylmercury in open Mediterranean waters. *Limnol. Oceanogr*, 54(3): 837-844.
- Crawford, J., 2013. Ringed Seals and Climate Change: Early Predictions Versus Recent Observations in Alaska. 28th Lowell Wakefield Fisheries Symposium(Responses of Arctic Marine Ecosystems to Climate Change).
- Crawford, J., Frost, K., Quakenbush, L., Whiting, A., 2012. Different habitat use strategies by subadult and adult ringed seals (*Phoca hispida*) in the Bering and Chukchi seas. *Polar Biology*, 35(2): 241-255.
- Das, R., Bizimis, M., Wilson, A.M., 2013. Tracing mercury seawater vs. atmospheric inputs in a pristine SE USA salt marsh system: Mercury isotope evidence. *Chemical Geology*, 336(0): 50-61.
- Das, R., Salters, V.J.M., Odom, A.L., 2009. A case for in vivo mass-independent fractionation of mercury isotopes in fish. *Geochem. Geophys. Geosyst.*, 10(11): Q11012.
- Dastoor, A.P., Durnford, D.A., 2013. Arctic Ocean: Is it a sink or a source of atmospheric mercury? *Environmental Science & Technology*.
- Day, R.D. et al., 2012. Mercury Stable Isotopes in Seabird Eggs Reflect a Gradient from Terrestrial Geogenic to Oceanic Mercury Reservoirs. *Environmental Science & Technology*, 46(10): 5327-5335.
- Dehn, L.-A. et al., 2006. Trophic relationships in an Arctic food web and implications for trace metal transfer. *Science of The Total Environment*, 362(1-3): 103-123.
- DeMaster, D.P., Stirling, I., 1981. *Ursus maritimus*. Soc.
- Derocher, A.E., Wiig, Ø., Andersen, M., 2002. Diet composition of polar bears in Svalbard and the western Barents Sea. *Polar Biology*, 25(6): 448-452.
- Dietz, R., Outridge, P.M., Hobson, K.A., 2009. Anthropogenic contributions to mercury levels in present-day Arctic animals—A review. *Science of The Total Environment*, 407(24): 6120-6131.
- Dietz, R., Riget, F., Born, E., 2000. Geographical differences of zinc, cadmium, mercury and selenium in polar bears (*Ursus maritimus*) from Greenland. *Science of The Total Environment*, 245(1): 25-47.
- Dietz, R., Riget, F., Johansen, P., 1996. Lead, cadmium, mercury and selenium in Greenland marine animals. *Science of The Total Environment*, 186(1-2): 67-93.
- Dommergue, A., Ferrari, C.P., Boutron, C.F., 2003. First investigation of an original device dedicated to the determination of gaseous mercury in interstitial air in snow. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 375(1): 106-111.
- Douglas, T.A. et al., 2012. The fate of mercury in Arctic terrestrial and aquatic ecosystems, a review. *Environmental Chemistry*, 9(4): 321-355.
- Durner, G.M., Amstrup, S.C., 1995. Movements of a polar bear from northern Alaska to northern Greenland. *Arctic*, 48(4): 338-341.
- Eagles-Smith, C.A., Ackerman, J.T., Yee, J., Adelsbach, T.L., 2009. Mercury demethylation in waterbird livers: dose-response thresholds and differences among species. *Environ Toxicol Chem*, 28(3): 568-577.
- Ebinghaus, R. et al., 2002. Antarctic springtime depletion of atmospheric mercury. *Environmental Science & Technology*, 36(6): 1238-1244.
- Eisler, R., 2010. *Mercury hazards to living organisms*. CRC Press.
- Epov, V.N. et al., 2010. Approach to Measure Isotopic Ratios in Species Using Multicollector-ICPMS Coupled with Chromatography. *Analytical Chemistry*, 82(13): 5652-5662.

- Epov, V.N., Malinovskiy, D., Vanhaecke, F., Bégué, D., Donard, O.F., 2011. Modern mass spectrometry for studying mass-independent fractionation of heavy stable isotopes in environmental and biological sciences. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 26(6): 1142-1156.
- Epov, V.N. et al., 2008. Simultaneous Determination of Species-Specific Isotopic Composition of Hg by Gas Chromatography Coupled to Multicollector ICPMS. *Analytical Chemistry*, 80(10): 3530-3538.
- Estrade, N., Carignan, J., Donard, O.F.X., 2010. Isotope Tracing of Atmospheric Mercury Sources in an Urban Area of Northeastern France. *Environmental Science & Technology*, 44(16): 6062-6067.
- Estrade, N., Carignan, J., Sonke, J.E., Donard, O.F.X., 2009. Mercury isotope fractionation during liquid-vapor evaporation experiments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 73(10): 2693-2711.
- Ewers, U., Krause, C., Schulz, C., Wilhelm, M., 1999. Reference values and human biological monitoring values for environmental toxins. *International archives of occupational and environmental health*, 72(4): 255-260.
- Farrington, J.W., 1991. Biogeochemical processes governing exposure and uptake of organic pollutant compounds in aquatic organisms. *Environmental health perspectives*, 90: 75.
- Ferrara, R. et al., 2003. Profiles of dissolved gaseous mercury concentration in the Mediterranean seawater. *Atmospheric Environment*, 37: 85-92.
- Ferrari, C.P. et al., 2008. Atmospheric mercury depletion event study in Ny-Alesund (Svalbard) in spring 2005. Deposition and transformation of Hg in surface snow during springtime. *Science of The Total Environment*, 397(1): 167-177.
- Fisher, J.A. et al., 2012. Riverine source of Arctic Ocean mercury inferred from atmospheric observations. *Nature Geosci*, 5(7): 499-504.
- Fitzgerald, W.F., Engstrom, D.R., Mason, R.P., Nater, E.A., 1998. The Case for Atmospheric Mercury Contamination in Remote Areas. *Environmental Science & Technology*, 32(1): 1-7.
- Foucher, D., Hintelmann, H., 2006. High-precision measurement of mercury isotope ratios in sediments using cold-vapor generation multi-collector inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384(7-8): 1470-1478.
- Foucher, D., Hintelmann, H., Al, T.A., MacQuarrie, K.T., 2013. Mercury isotope fractionation in waters and sediments of the Murray Brook mine watershed (New Brunswick, Canada): Tracing mercury contamination and transformation. *Chemical Geology*, 336(0): 87-95.
- Frost, K., J. & Lowry, L.F. (1981). Trophic importance of some marine gadids in northern Alaska and their body-otolith size relationships. *Fishery Bulletin*, 79: 187-192.
- Frost, K., Lowry, L., 1990. Distribution, abundance, and movements of beluga whales, *Delphinapterus leucas*, in coastal waters of western Alaska. *Advances in research on the beluga whale, Delphinapterus leucas*. *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci*, 224: 39-57.
- Frost, K.J., Lowry, L.F., 1981. Ringed, Baikal and Caspian seals. *Handbook of marine mammals*, 2: 29-54.
- Fujii, Y., Nomura, M., Onitsuka, H., TAKEDA, K., 1989. Anomalous isotope fractionation in uranium enrichment process. *Journal of Nuclear Science and Technology*, 26(11): 1061-1064.
- Gaden, A., Ferguson, S.H., Harwood, L., Melling, H., Stern, G.A., 2009. Mercury Trends in Ringed Seals (*Phoca hispida*) from the Western Canadian Arctic since 1973: Associations with Length of Ice-Free Season. *Environmental Science & Technology*, 43(10): 3646-3651.

- Gantner, N., Hintelmann, H., Zheng, W., Muir, D.C., 2009. Variations in Stable Isotope Fractionation of Hg in Food Webs of Arctic Lakes. *Environmental Science & Technology*, 43(24): 9148-9154.
- Garner, G.W., Knick, S.T., Douglas, D.C., 1990. Seasonal movements of adult female polar bears in the Bering and Chukchi Seas. *Bears: Their Biology and Management*: 219-226.
- Ghosh, S., Schauble, E.A., Lacrampe Couloume, G., Blum, J.D., Bergquist, B.A., 2013. Estimation of nuclear volume dependent fractionation of mercury isotopes in equilibrium liquid-vapor evaporation experiments. *Chemical Geology*, 336(0): 5-12.
- Ghosh, S., Xu, Y., Humayun, M., Odom, L., 2008. Mass-independent fractionation of mercury isotopes in the environment. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 9(3).
- Goldwater, L.J., 1972. Mercury: a history of quicksilver.
- Goodsite, M.E., Plane, J., Skov, H., 2004. A theoretical study of the oxidation of Hg⁰ to HgBr₂ in the troposphere. *Environmental Science & Technology*, 38(6): 1772-1776.
- Goyer, R.A., Clarkson, T.W., 1996. Toxic effects of metals. *Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons, Fifth Edition*, Klaassen, CD [Ed]. McGraw-Hill Health Professions Division, ISBN, 71054766.
- Grandjean, P., Weihe, P., White, R.F., 1995. Milestone development in infants exposed to methylmercury from human milk. *NeuroToxicology*, 16(1): 27-33.
- Grandjean, P. et al., 1997. Cognitive Deficit in 7-Year-Old Children with Prenatal Exposure to Methylmercury. *Neurotoxicology and Teratology*, 19(6): 417-428.
- Gratz, L.E., Keeler, G.J., Blum, J.D., Sherman, L.S., 2010. Isotopic composition and fractionation of mercury in Great Lakes precipitation and ambient air. *Environmental Science & Technology*, 44(20): 7764-7770.
- Greig, G., Gunning, H.E., Strausz, O.P., 1970. Reactions of Metal Atoms. II. The Combination of Mercury and Bromine Atoms and the Dimerization of HgBr. *The Journal of Chemical Physics*, 52(7): 3684-3690.
- Grissom, C.B., 1995. Magnetic field effects in biology: A survey of possible mechanisms with emphasis on radical-pair recombination. *Chemical Reviews*, 95(1): 3-24.
- Gross, M., Harrison, J., 1989. Some electrochemical features of their vivo corrosion of dental amalgams. *Journal of applied electrochemistry*, 19(3): 301-310.
- Hahn, A. et al., 1979. An experimental study of muonic X-Ray transitions in mercury isotopes. *Nuclear Physics A*, 314(2): 361-386.
- Hall, L.L., Allen, P.V., Fisher, H.L., Most, B., 1995. The kinetics of intravenously administered inorganic mercury in humans. *Kinetic Models of Trace Element and Mineral Metabolism During Development*: 265.
- Hammerschmidt, C.R., Fitzgerald, W.F., 2006. Photodecomposition of methylmercury in an arctic Alaskan lake. *Environmental Science & Technology*, 40(4): 1212-1216.
- Hammerschmidt, C.R., Fitzgerald, W.F., 2010. Iron-mediated photochemical decomposition of methylmercury in an arctic Alaskan lake. *Environmental Science & Technology*, 44(16): 6138-6143.
- Hammerschmidt, C.R., Fitzgerald, W.F., Lamborg, C.H., Balcom, P.H., Visscher, P.T., 2004. Biogeochemistry of methylmercury in sediments of Long Island Sound. *Marine Chemistry*, 90(1): 31-52.
- Hansen, C.T., Nielsen, C.O., Dietz, R., Hansen, M.M., 1990. Zinc, cadmium, mercury and selenium in minke whales, belugas and narwhals from West Greenland. *Polar Biology*, 10(7): 529-539.
- Hansen, J.C., Van Oostdam, J., 2009. AMAP Assessment 2009: Human Health in the Arctic.
- Harada, M., 1995. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 25(1): 1-24.

- Harris, R. et al., 2010. Ecosystem responses to mercury contamination: Indicators of change. CRC Press.
- Harwood, L.A., Smith, T.G., Auld, J.C., 2012. Fall migration of ringed seals (*Phoca hispida*) through the Beaufort and Chukchi seas, 2001–02. *Arctic*, 65: 35-44.
- Heide-Jørgensen, M.-P., Teilmann, J., 1994. Growth, reproduction, age structure and feeding habits of belugas (*Delphinapterus leucas*) in West Greenland waters. *Meddelelser om Grønland-Bioscience*, 39: 195-212.
- Heimbürger, L.-E. et al., 2010. Methyl mercury distributions in relation to the presence of nano- and picophytoplankton in an oceanic water column (Ligurian Sea, North-western Mediterranean). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74(19): 5549-5559.
- Heimbürger, L. et al., 2013. Arctic Ocean methylmercury profiles suggest a marine origin, influenced by the carbon cycle - Results from the 2011 GEOTRACES Arctic cruise. 11th International Conference on Mercury as a Global Pollutant, Edinburgh, Scotland.
- Hintelmann, H., 2009. Organomercurials. Their formation and pathways in the environment. *Metal ions in life sciences*, 7: 365-401.
- Hintelmann, H., Lu, S., 2003. High precision isotope ratio measurements of mercury isotopes in cinnabar ores using multi-collector inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analyst*, 128(6): 635-639.
- Hobbs, R., Laidre, K., Vos, D., Mahoney, B., Eagleton, M., 2005. Movements and Area Use of Belugas, *Delphinapterus leucas*, in a Subarctic Alaskan Estuary. *Arctic*, 58(4).
- Hoefs, J., 1997. Stable isotope geochemistry.
- Hollweg, T., Gilmour, C., Mason, R., 2009. Methylmercury production in sediments of Chesapeake Bay and the mid-Atlantic continental margin. *Marine Chemistry*, 114(3): 86-101.
- Holmes, C.D., Jacob, D.J., Mason, R.P., Jaffe, D.A., 2009. Sources and deposition of reactive gaseous mercury in the marine atmosphere. *Atmospheric Environment*, 43(14): 2278-2285.
- Hu, H., 2000. Exposure to metals. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 27(4): 983-996.
- Huntington, H.P., 2002. Traditional Knowledge of the Ecology of Belugas, *Delphinapterus leucas*, in Cook Inlet, Alaska. *Marine Fisheries Review*, 62(3): 134-140.
- Ikemoto, T. et al., 2004. Detoxification mechanism of heavy metals in marine mammals and seabirds: interaction of selenium with mercury, silver, copper, zinc, and cadmium in liver. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 47(3): 402-413.
- Itano et al., 1984. Mercury and selenium levels in striped dolphins caught off the Pacific coast of Japan, 48. Agricultural Chemical Society of Japan, Tokyo, JAPON.
- Jackson, T.A., Whittle, D.M., Evans, M.S., Muir, D.C.G., 2008. Evidence for mass-independent and mass-dependent fractionation of the stable isotopes of mercury by natural processes in aquatic ecosystems. *Applied Geochemistry*, 23(3): 547-571.
- JENSEN, S., Jernelöv, A., 1969. Biological methylation of mercury in aquatic organisms.
- Jiménez-Moreno, M., Perrot, V., Epov, V.N., Monperrus, M., Amouroux, D., 2013. Chemical kinetic isotope fractionation of mercury during abiotic methylation of Hg(II) by methylcobalamin in aqueous chloride media. *Chemical Geology*, 336(0): 26-36.
- Jochmann, M.A., Schmidt, T.C., 2012. Compound-Specific Stable Isotope Analysis. Royal Society of Chemistry.
- Johnson, C.M., Beard, B.L., Albarède, F., Union, C.G., 2004. Geochemistry of non-traditional stable isotopes. Mineralogical Society of America Washington, DC.
- Keating, M.H., Mahaffey, K.R., Schoeny, R., Rice, G., Bullock, O., 1997. Mercury study report to Congress. Volume 1. Executive summary, Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, NC (United States). Office of Air Quality Planning and Standards.

- Kelly, B. et al., 2010a. Seasonal home ranges and fidelity to breeding sites among ringed seals. *Polar Biology*, 33(8): 1095-1109.
- Kelly, B.P. et al., 2010b. Status Review of the Ringed Seal (*Phoca hispida*).
- Kershaw, T.G., Dhahir, P.H., Clarkson, T.W., 1980. The relationship between blood levels and dose of methylmercury in man. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 35(1).
- Khan, M.A., Wang, F., 2010. Chemical demethylation of methylmercury by selenoamino acids. *Chemical research in toxicology*, 23(7): 1202-1206.
- Kirk, J.L. et al., 2012. Mercury in Arctic marine ecosystems: Sources, pathways and exposure. *Environmental Research*, 119: 64-87.
- Kirk, J.L. et al., 2008. Methylated mercury species in marine waters of the Canadian high and sub Arctic. *Environmental Science & Technology*, 42(22): 8367-8373.
- Koeman, J.H., Peeters, W., Koudstaal-Hol, C.H.M., Tjioe, P., De Goeij, J., 1973. Mercury-selenium correlations in marine mammals.
- Kovacs, K., 2007. Background document for development of a circumpolar ringed seal (*Phoca hispida*) monitoring plan. Marine Mammal Commission, Workshop to Develop.
- Kozin, L.F., Hansen, S.C., 2013. Mercury Handbook: Chemistry, Applications and Environmental Impact. Royal Society of Chemistry.
- Kritee, K., Barkay, T., Blum, J.D., 2009. Mass dependent stable isotope fractionation of mercury during mer mediated microbial degradation of monomethylmercury. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 73(5): 1285-1296.
- Kritee, K., Blum, J.D., Barkay, T., 2008. Mercury Stable Isotope Fractionation during Reduction of Hg(II) by Different Microbial Pathways. *Environmental Science & Technology*, 42(24): 9171-9177.
- Kritee, K., Blum, J.D., Johnson, M.W., Bergquist, B.A., Barkay, T., 2007. Mercury stable isotope fractionation during reduction of Hg(II) to Hg(0) by mercury resistant microorganisms. *Environ Sci Technol*, 41(6): 1889-95.
- Kritee, K., Blum, J.D., Reinfelder, J.R., Barkay, T., 2013. Microbial stable isotope fractionation of mercury: A synthesis of present understanding and future directions. *Chemical Geology*, 336(0): 13-25.
- Kuder, T., 2012. Introduction to compound specific analysis (CSIA). Meeting of the technical support project Oklahoma City.
- Kuhnert, P., Kuhnert, B., Erhard, P., 1981. Comparison of mercury levels in maternal blood, fetal cord blood, and placental tissues. *American journal of obstetrics and gynecology*, 139(2): 209-213.
- Kwon, S.Y. et al., 2012. Absence of Fractionation of Mercury Isotopes during Trophic Transfer of Methylmercury to Freshwater Fish in Captivity. *Environmental Science & Technology*, 46(14): 7527-7534.
- Laffont, L., 2009. Fractionnement des isotopes stables de mercure dans un écosystème tropical en Amazonie bolivienne et dans les cheveux de populations humaines exposées, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.
- Laffont, L. et al., 2009. Anomalous Mercury Isotopic Compositions of Fish and Human Hair in the Bolivian Amazon. *Environmental Science & Technology*, 43(23): 8985-8990.
- Laffont, L. et al., 2011. Hg speciation and stable isotope signatures in human hair as a tracer for dietary and occupational exposure to mercury. *Environmental Science & Technology*, 45(23): 9910-9916.
- Lailson-Brito, J. et al., 2012. Mercury-Selenium Relationships in Liver of Guiana Dolphin: The Possible Role of Kupffer Cells in the Detoxification Process by Tiemannite Formation. *PLoS ONE*, 7(7): e42162.

- Lalonde, J.D., Poulain, A.J., Amyot, M., 2002. The role of mercury redox reactions in snow on snow-to-air mercury transfer. *Environmental Science & Technology*, 36(2): 174-178.
- Lamborg, C.H., Fitzgerald, W.F., O'Donnell, J., Torgersen, T., 2002. A non-steady-state compartmental model of global-scale mercury biogeochemistry with interhemispheric atmospheric gradients. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 66(7): 1105-1118.
- Larose, C. et al., 2011. Bioavailable mercury cycling in polar snowpacks. *Environmental Science & Technology*, 45(6): 2150-2156.
- Lauretta, D.S., Klaue, B., Blum, J.D., Buseck, P.R., 2001. Mercury abundances and isotopic compositions in the Murchison (CM) and Allende (CV) carbonaceous chondrites. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65(16): 2807-2818.
- Lauwerys, R.R., Haufroid, V., Hoet, P., Lison, D., 1990. Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles. Masson Paris.
- Legrand, M., Freeley, M., Tikhonov, C., Schoen, D., Li-Muller, A., 2010. Methylmercury blood guidance values for Canada. *Can J Public Health*, 101(1): 28-31.
- Lehnher, I., St. Louis, V.L., Emmerton, C.A., Barker, J.D., Kirk, J.L., 2012. Methylmercury cycling in high arctic wetland ponds: sources and sinks. *Environmental Science & Technology*, 46(19): 10514-10522.
- Lehnher, I., St. Louis, V.L., Hintelmann, H., Kirk, J.L., 2011. Methylation of inorganic mercury in polar marine waters. *Nature Geosci*, 4(5): 298-302.
- Leitch, D.R. et al., 2007. The delivery of mercury to the Beaufort Sea of the Arctic Ocean by the Mackenzie River. *Science of The Total Environment*, 373(1): 178-195.
- Letcher, R.J. et al., 2010. Exposure and effects assessment of persistent organohalogen contaminants in arctic wildlife and fish. *Science of The Total Environment*, 408(15): 2995-3043.
- Li, M. et al., 2014. Assessing Sources of Human Methylmercury Exposure Using Stable Mercury Isotopes. *Environmental Science & Technology*.
- Lindberg, S. et al., 2001. Formation of reactive gaseous mercury in the Arctic: evidence of oxidation of Hg to gas-phase Hg-II compounds after Arctic sunrise. *Water, Air and Soil Pollution: Focus*, 1(5-6): 295-302.
- Lindberg, S. et al., 2007. A synthesis of progress and uncertainties in attributing the sources of mercury in deposition. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 36(1): 19-33.
- Lindberg, S.E. et al., 2002. Dynamic oxidation of gaseous mercury in the Arctic troposphere at polar sunrise. *Environmental Science & Technology*, 36(6): 1245-1256.
- Liu, G., Cai, Y., O'Driscoll, N., 2011. Environmental chemistry and toxicology of mercury. John Wiley & Sons.
- Lockhart, W.L. et al., 2005. Concentrations of mercury in tissues of beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from several communities in the Canadian Arctic from 1981 to 2002. *Science of The Total Environment*, 351-352(0): 391-412.
- Loseto, L.L., Lean, D.R., Siciliano, S.D., 2004. Snowmelt sources of methylmercury to High Arctic ecosystems. *Environmental Science & Technology*, 38(11): 3004-3010.
- Loseto, L.L., Stern, G.A., Ferguson, S.H., 2008. Size and Biomagnification: How Habitat Selection Explains Beluga Mercury Levels. *Environmental Science & Technology*, 42(11): 3982-3988.
- Lyons, J., Young, E., 2005. CO self-shielding as the origin of oxygen isotope anomalies in the early solar nebula. *Nature*, 435(7040): 317-320.
- Macdonald, R.W., Harner, T., Fyfe, J., 2005. Recent climate change in the Arctic and its impact on contaminant pathways and interpretation of temporal trend data. *Science of The Total Environment*, 342(1-3): 5-86.

- Maggi, C., Berducci, M.T., Bianchi, J., Giani, M., Campanella, L., 2009. Methylmercury determination in marine sediment and organisms by Direct Mercury Analyser. *Analytica Chimica Acta*, 641(1): 32-36.
- Malinovsky, D., Latruwe, K., Moens, L., Vanhaecke, F., 2010. Experimental study of mass-independence of Hg isotope fractionation during photodecomposition of dissolved methylmercury. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 25(7): 950-956.
- Malinovsky, D., Vanhaecke, F., 2011. Mercury isotope fractionation during abiotic transmethylation reactions. *International Journal of Mass Spectrometry*, 307(1): 214-224.
- Malm, O., 1998. Gold mining as a source of mercury exposure in the Brazilian Amazon. *Environmental Research*, 77(2): 73-78.
- Masbou, J., Point, D., Sonke, J., Becker, P., 2012. Mercury Stable Isotope Time Trends in Cryogenically Archived Ringed Seal Livers from the Alaskan Arctic. 76(6): 2077.
- Masbou, J., Point, D., Sonke, J.E., 2013. Application of a selective extraction method for methylmercury compound specific stable isotope analysis (MeHg-CSIA) in biological materials. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*.
- Mason, R.a., Sullivan, K., 1999. The distribution and speciation of mercury in the South and equatorial Atlantic. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 46(5): 937-956.
- Mason, R.P., 2001. The bioaccumulation of mercury, methylmercury and other toxic elements into pelagic and benthic organisms. *Coastal and Estuarine Risk Assessment*, CRC/Lewis Publ: 127-149.
- Mason, R.P. et al., 2012. Mercury biogeochemical cycling in the ocean and policy implications. *Environmental Research*, 119(0): 101-117.
- Mason, R.P., Reinfelder, J.R., Morel, F.M.M., 1995a. Bioaccumulation of mercury and methylmercury. *Water, Air, and Soil Pollution*, 80(1-4): 915-921.
- Mason, R.P., Reinfelder, J.R., Morel, F.M.M., 1996. Uptake, Toxicity, and Trophic Transfer of Mercury in a Coastal Diatom. *Environmental Science & Technology*, 30(6): 1835-1845.
- Mason, R.P., Rolfhus, K.R., Fitzgerald, W.F., 1995b. Methylated and Elemental Mercury Cycling in Surface and Deep Ocean Waters of the North Atlantic. In: Porcella, D., Huckabee, J., Wheatley, B. (Eds.), *Mercury as a Global Pollutant*. Springer Netherlands, pp. 665-677.
- Mason, R.P., Sheu, G.R., 2002. Role of the ocean in the global mercury cycle. *Global biogeochemical cycles*, 16(4): 40-1-40-14.
- Mead, C., Lyons, J.R., Johnson, T.M., Anbar, A.D., 2013. Unique Hg Stable Isotope Signatures of Compact Fluorescent Lamp-Sourced Hg. *Environmental Science & Technology*, 47(6): 2542-2547.
- Medvedev, N., Panichev, N., Hyvärinen, H., 1997. Levels of heavy metals in seals of Lake Ladoga and the White Sea. *Science of The Total Environment*, 206(2): 95-105.
- Melnick, J.G., Parkin, G., 2007. Cleaving mercury-alkyl bonds: a functional model for mercury detoxification by MerB. *Science*, 317(5835): 225-227.
- Méthé, B.A. et al., 2005. The psychrophilic lifestyle as revealed by the genome sequence of *Colwellia psychrerythraea* 34H through genomic and proteomic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31): 10913-10918.
- Monperrus, M. et al., 2007. Mercury methylation, demethylation and reduction rates in coastal and marine surface waters of the Mediterranean Sea. *Marine Chemistry*, 107(1): 49-63.
- Morel, F.M.M., Kraepiel, A.M.L., Amyot, M., 1998. The Chemical Cycle and Bioaccumulation of Mercury. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29(ArticleType: research-article / Full publication date: 1998 / Copyright © 1998 Annual Reviews): 543-566.

- Muccio, Z., Jackson, G.P., 2009. Isotope ratio mass spectrometry. *Analyst*, 134(2): 213-222.
- Muckle, G., Ayotte, P., 2001. Prenatal exposure of the northern Quebec Inuit infants to environmental contaminants. *Environmental health perspectives*, 109(12): 1291.
- Mulliken, R.S., Harkins, W.D., 1922. THE SEPARATION OF ISOTOPES. THEORY OF RESOLUTION OF ISOTOPIC MIXTURES BY DIFFUSION AND SIMILAR PROCESSES. EXPERIMENTAL SEPARATION OF MERCURY BY EVAPORATION IN A VACUUM. *Journal of the American Chemical Society*, 44(1): 37-65.
- Munthe, J., 1992. The aqueous oxidation of elemental mercury by ozone. *Atmospheric Environment. Part A. General Topics*, 26(8): 1461-1468.
- Nakagawa, R., Yumita, Y., Hiromoto, M., 1997. Total mercury intake from fish and shellfish by Japanese people. *Chemosphere*, 35(12): 2909-2913.
- Nier, A.O., 1937. A Mass-Spectrographic Study of the Isotopes of Hg, Xe, Kr, Be, I, As, and Cs. *Physical Review*, 52(9): 933.
- Nier, A.O., 1950. A redetermination of the relative abundances of the isotopes of neon, krypton, rubidium, xenon, and mercury. *Physical Review*, 79(3): 450.
- Nigro, M., 1994. Mercury and selenium localization in macrophages of the striped dolphin, *Stenella coeruleoalba*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 74(04): 975-978.
- Norheim, G., Skaare, J.U., Wiig, Ø., 1992. Some heavy metals, essential elements, and chlorinated hydrocarbons in polar bear (*Ursus maritimus*) at Svalbard. *Environmental Pollution*, 77(1): 51-57.
- Norton, S., 1986. Toxic responses of the central nervous system. *Casarett and Doull's Toxicology*.
- NRCC, 2000. *Toxicological Effects of Methylmercury*. The National Academies Press.
- Nriagu, J.O., 1989. A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature*, 338(6210): 47-49.
- O'Corry-Crowe, G., Suydam, R., Rosenberg, A., Frost, K., Dizon, A., 1997. Phylogeography, population structure and dispersal patterns of the beluga whale *Delphinapterus leucas* in the western Nearctic revealed by mitochondrial DNA. *Molecular Ecology*, 6(10): 955-970.
- Ordóñez, J.V., Carrillo, J.A., Miranda, M., Gale, J.L., 1966. Estudio epidemiológico de una enfermedad considerada como encefalitis en la region de Los Altos de Guatemala. *Bol Of Sanit Panam*, 60: 510-516.
- Oremland, R.S., Culbertson, C.W., Winfrey, M.R., 1991. Methylmercury decomposition in sediments and bacterial cultures: involvement of methanogens and sulfate reducers in oxidative demethylation. *Applied and environmental microbiology*, 57(1): 130-137.
- Outridge, P.M., Hobson, K.A., Savelle, J., 2009. Long-term changes of mercury levels in ringed seal (*Phoca hispida*) from Amundsen Gulf, and beluga (*Delphinapterus leucas*) from the Beaufort Sea, western Canadian Arctic. *Science of The Total Environment*, 407(23): 6044-6051.
- Outridge, P.M., Macdonald, R.W., Wang, F., Stern, G.A., Dastoor, A.P., 2008. A mass balance inventory of mercury in the Arctic Ocean. *Environmental Chemistry*, 5(2): 89-111.
- Ozuah, P.O., 2000. Mercury poisoning. *Current problems in pediatrics*, 30(3): 91-99.
- Pacyna, E.G. et al., 2010. Global emission of mercury to the atmosphere from anthropogenic sources in 2005 and projections to 2020. *Atmospheric Environment*, 44(20): 2487-2499.
- Pacyna, E.G., Pacyna, J.M., Steenhuisen, F., Wilson, S., 2006. Global anthropogenic mercury emission inventory for 2000. *Atmospheric Environment*, 40(22): 4048-4063.
- Paetkau, D. et al., 1999. Genetic structure of the world's polar bear populations. *Molecular Ecology*, 8(10): 1571-1584.

- Parks, J.M. et al., 2013. The Genetic Basis for Bacterial Mercury Methylation. *Science*, 339(6125): 1332-1335.
- Pavlish, J.H. et al., 2003. Status review of mercury control options for coal-fired power plants. *Fuel Processing Technology*, 82(2–3): 89-165.
- Pavlov, A., Kasting, J., 2002. Mass-independent fractionation of sulfur isotopes in Archean sediments: strong evidence for an anoxic Archean atmosphere. *Astrobiology*, 2(1): 27-41.
- Perrin, W.F., Wursig, B., Thewissen, J., 2009. *Encyclopedia of marine mammals*. Academic Press.
- Perrot, V., 2012. Spéciation isotopique et moléculaire du mercure dans les environnements aquatiques influencée par des processus biotiques et abiotiques, Pau.
- Perrot, V. et al., 2010. Tracing Sources and Bioaccumulation of Mercury in Fish of Lake Baikal–Angara River Using Hg Isotopic Composition. *Environmental Science & Technology*, 44(21): 8030-8037.
- Perrot, V. et al., 2012. Higher mass-independent isotope fractionation of methylmercury in the pelagic food web of Lake Baikal (Russia). *Environmental Science & Technology*, 46(11): 5902-5911.
- Peterson, B.J. et al., 2002. Increasing river discharge to the Arctic Ocean. *Science*, 298(5601): 2171-2173.
- Peterson, T.C., Baringer, M., 2009. State of the climate in 2008. *Bulletin of the American Meteorological Society*, 90(8): S1-S196.
- Pickhardt, P.C., Folt, C.L., Chen, C.Y., Klaue, B., Blum, J.D., 2002. Algal blooms reduce the uptake of toxic methylmercury in freshwater food webs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(7): 4419-4423.
- Pickhardt, P.C., Folt, C.L., Chen, C.Y., Klaue, B., Blum, J.D., 2005. Impacts of zooplankton composition and algal enrichment on the accumulation of mercury in an experimental freshwater food web. *Science of The Total Environment*, 339(1): 89-101.
- Pirrone, N. et al., 2010. Global mercury emissions to the atmosphere from anthropogenic and natural sources. *Atmos. Chem. Phys.*, 10(13): 5951-5964.
- Pirrone, N., Mason, R.P., 2009. *Mercury fate and transport in the global atmosphere: emissions, measurements and models*. Springer.
- Point, D. et al., 2008. Consideration and influence of complexed forms of mercury species on the reactivity patterns determined by speciated isotope dilution model approaches: A case for natural biological reference materials. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23(3): 385-396.
- Point, D. et al., 2007. Development and application of an ultratrace method for speciation of organotin compounds in cryogenically archived and homogenized biological materials. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(7): 2343-2355.
- Point, D. et al., 2011. Methylmercury photodegradation influenced by sea-ice cover in Arctic marine ecosystems. *Nature Geosci*, 4(3): 188-194.
- Poissant, L., Pilote, M., 2003. Time series analysis of atmospheric mercury in Kuujjuarapik/Whapmagoostui (Quebec), *Journal de Physique IV (Proceedings)*. EDP sciences, pp. 1079-1082.
- Ponce, R.A., Egeland, G.M., Middaugh, J.P., Becker, P.R., Twenty years of trace metal analyses of marine mammals.
- Pongratz, R., Heumann, K., 1998a. Production of methylated mercury and lead by polar macroalgae—a significant natural source for atmospheric heavy metals in clean room compartments. *Chemosphere*, 36(9): 1935-1946.

- Pongratz, R., Heumann, K.G., 1998b. Determination of concentration profiles of methyl mercury compounds in surface waters of polar and other remote oceans by GC-AFD. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 71(1): 41-56.
- Pongratz, R., Heumann, K.G., 1999. Production of methylated mercury, lead, and cadmium by marine bacteria as a significant natural source for atmospheric heavy metals in polar regions. *Chemosphere*, 39(1): 89-102.
- Pyle, D.M., Mather, T.A., 2003. The importance of volcanic emissions for the global atmospheric mercury cycle. *Atmospheric Environment*, 37(36): 5115-5124.
- Rankin, A., Auld, V., Wolff, E., 2000. Frost flowers as a source of fractionated sea salt aerosol in the polar regions. *Geophysical Research Letters*, 27(21): 3469-3472.
- Ravichandran, M., 2004. Interactions between mercury and dissolved organic matter—a review. *Chemosphere*, 55(3): 319-331.
- Reeves, R.R. et al., 2014. Distribution of endemic cetaceans in relation to hydrocarbon development and commercial shipping in a warming Arctic. *Marine Policy*, 44(0): 375-389.
- Rigét, F. et al., 2011. Temporal trends of Hg in Arctic biota, an update. *Science of The Total Environment*, 409(18): 3520-3526.
- Riget, F., Dietz, R., Hobson, K.A., 2012. Temporal trends of mercury in Greenland ringed seal populations in a warming climate. *Journal of Environmental Monitoring*, 14(12): 3249-3256.
- Riget, F. et al., 2005. Circumpolar pattern of mercury and cadmium in ringed seals. *Science of The Total Environment*, 351–352(0): 312-322.
- Riget, F., Vorkamp, K., Dietz, R., Rastogi, S.C., 2006. Temporal trend studies on polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in ringed seals from East Greenland. *Journal of Environmental Monitoring*, 8(10): 1000-1005.
- Rodier, P.M., 1995. Developing brain as a target of toxicity. *Environmental health perspectives*, 103(Suppl 6): 73.
- Rodríguez-González, P. et al., 2009. Species-specific stable isotope fractionation of mercury during Hg (II) methylation by an anaerobic bacteria (*Desulfobulbus propionicus*) under dark conditions. *Environmental Science & Technology*, 43(24): 9183-9188.
- Rose, C.H., 2010. *Mass-independent Fractionation of Mercury Isotopes in Freshwater Systems*, University of Toronto.
- Rush, S.A. et al., 2008. Geographic distribution of selected elements in the livers of polar bears from Greenland, Canada and the United States. *Environmental Pollution*, 153(3): 618-626.
- Sager, P., Aschner, M., Rodier, P., 1984. Persistent, differential alterations in developing cerebellar cortex of male and female mice after methylmercury exposure. *Developmental Brain Research*, 12(1): 1-11.
- Satoh, H., 1994. Toxicological Properties and Metabolism of Mercury with an Emphasis on a Possible Method for Estimating Residual Amounts of Mercury in the Body, Proc. of the International Workshop on Environmental Mercury Pollution and its Health Effects in Amazon River Basin, pp. 106-112.
- Schauble, E.A., 2007. Role of nuclear volume in driving equilibrium stable isotope fractionation of mercury, thallium, and other very heavy elements. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71(9): 2170-2189.
- Schliebe, S., Wiig, Ø., Derocher, A., Lunn, N., 2008. (IUCN SSC Polar Bear Specialist Group). *Ursus maritimus*. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. <.
- Schroeder, W.H., Munthe, J., 1998. Atmospheric mercury—An overview. *Atmospheric Environment*, 32(5): 809-822.

- Scott, K., Lu, X., Cavanaugh, C., Liu, J., 2004. Optimal methods for estimating kinetic isotope effects from different forms of the Rayleigh distillation equation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 68(3): 433-442.
- Seigneur, C., Wrobel, J., Constantinou, E., 1994. A chemical kinetic mechanism for atmospheric inorganic mercury. *Environmental Science & Technology*, 28(9): 1589-1597.
- Selin, N.E., 2009. Global biogeochemical cycling of mercury: a review. *Annual Review of Environment and Resources*, 34(1): 43.
- Selin, N.E. et al., 2008. Global 3-D land-ocean-atmosphere model for mercury: Present-day versus preindustrial cycles and anthropogenic enrichment factors for deposition. *Global biogeochemical cycles*, 22(2).
- Seller, P., Kelly, C., Rudd, J., MacHutchon, A., 1996a. Photodegradation of methylmercury in lakes.
- Seller, P., Kelly, C.A., Rudd, J.W.M., MacHutchon, A.R., 1996b. Photodegradation of methylmercury in lakes. *Nature*, 380(6576): 694-697.
- Senn, D.B. et al., 2010. Stable Isotope (N, C, Hg) Study of Methylmercury Sources and Trophic Transfer in the Northern Gulf of Mexico. *Environmental Science & Technology*, 44(5): 1630-1637.
- Shepler, B.C., Balabanov, N.B., Peterson, K.A., 2007. $\text{Hg}^+ + \text{Br} \rightarrow \text{HgBr}$ recombination and collision-induced dissociation dynamics. *The Journal of Chemical Physics*, 127(16): 164304.
- Sherman, L. et al., 2009. Mercury isotopic composition of hydrothermal systems in the Yellowstone Plateau volcanic field and Guaymas Basin sea-floor rift. *Earth and Planetary Science Letters*, 279(1): 86-96.
- Sherman, L.S. et al., 2010. Mass-independent fractionation of mercury isotopes in Arctic snow driven by sunlight. *Nature Geosci*, 3(3): 173-177.
- Sheu, G.-R., Mason, R.P., 2004. An examination of the oxidation of elemental mercury in the presence of halide surfaces. *Journal of atmospheric chemistry*, 48(2): 107-130.
- Simpson, W. et al., 2007. Halogens and their role in polar boundary-layer ozone depletion. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 7(16): 4375-4418.
- Smith, C.N., Kesler, S.E., Blum, J.D., Rytuba, J.J., 2008. Isotope geochemistry of mercury in source rocks, mineral deposits and spring deposits of the California Coast Ranges, USA. *Earth and Planetary Science Letters*, 269(3): 399-407.
- Smith, C.N., Kesler, S.E., Klaue, B., Blum, J.D., 2005. Mercury isotope fractionation in fossil hydrothermal systems. *Geology*, 33(10): 825-828.
- Smith, T., Pitts, K., McGarvey, J.A., Summers, A.O., 1998. Bacterial oxidation of mercury metal vapor, $\text{Hg}(0)$. *Applied and environmental microbiology*, 64(4): 1328-1332.
- Smith, T.G., 1980. Polar bear predation of ringed and bearded seals in the land-fast sea ice habitat. *Canadian Journal of Zoology*, 58(12): 2201-2209.
- Smith, T.G., 1987. The ringed seal, *Phoca hispida*, of the Canadian western Arctic. Department of Fisheries and Oceans.
- Smith, T.G., Stirling, I., 1975. The breeding habitat of the ringed seal (*Phoca hispida*). The birth lair and associated structures. *Canadian Journal of Zoology*, 53(9): 1297-1305.
- Sommerer, T.J., 1993. A Monte Carlo simulation of resonance radiation transport in the rare-gas-mercury positive column. *Journal of applied physics*, 74(3): 1579-1589.
- Sonke, J.E., 2011. A global model of mass independent mercury stable isotope fractionation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75(16): 4577-4590.
- Steffen, A. et al., 2008. A synthesis of atmospheric mercury depletion event chemistry in the atmosphere and snow. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 8(6): 1445-1482.

- Steffen, A., Schroeder, W., Macdonald, R., Poissant, L., Konoplev, A., 2005. Mercury in the Arctic atmosphere: An analysis of eight years of measurements of GEM at Alert (Canada) and a comparison with observations at Amderma (Russia) and Kuujuarapik (Canada). *Science of The Total Environment*, 342(1–3): 185-198.
- Streets, D.G. et al., 2011. All-time releases of mercury to the atmosphere from human activities. *Environmental Science & Technology*, 45(24): 10485-10491.
- Suda, I., Hirayama, K., 1992. Degradation of methyl and ethyl mercury into inorganic mercury by hydroxyl radical produced from rat liver microsomes. *Arch Toxicol*, 66(6): 398-402.
- Suda, I., Totoki, S., Uchida, T., Takahashi, H., 1992. Degradation of methyl and ethyl mercury into inorganic mercury by various phagocytic cells. *Archives of toxicology*, 66(1): 40-44.
- Sugio, T. et al., 2001. Cytochrome *c* oxidase purified from a mercury-resistant strain of *Acidithiobacillus ferrooxidans* volatilizes mercury. *Journal of bioscience and bioengineering*, 92(1): 44-49.
- Sun, R. et al., 2013. Mercury stable isotope fractionation in six utility boilers of two large coal-fired power plants. *Chemical Geology*, 336(0): 103-111.
- Sunderland et al., 2009. Mercury sources, distribution, and bioavailability in the North Pacific Ocean: Insights from data and models, 23. American Geophysical Union, Washington, DC, ETATS-UNIS.
- Sunderland, E.M. et al., 2010. Response of a macrotidal estuary to changes in anthropogenic mercury loading between 1850 and 2000. *Environmental Science & Technology*, 44(5): 1698-1704.
- Sunderland, E.M., Mason, R.P., 2007. Human impacts on open ocean mercury concentrations. *Global biogeochemical cycles*, 21(4).
- Suydam, R.S., 2009. Age, growth, reproduction, and movements of beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the eastern Chukchi Sea, University of Washington.
- Suydam, R.S., Lowry, L.F., Frost, K.J., O'Corry-Crowe, G.M., Pikok, D., 2001. Satellite tracking of eastern Chukchi Sea beluga whales into the Arctic Ocean. *Arctic*, 54(3): 237-243.
- Thiemens, M.H., Heidenreich, J.E., 1983. The mass-independent fractionation of oxygen: A novel isotope effect and its possible cosmochemical implications. *Science*, 219(4588): 1073-1075.
- Tian, W., Egeland, G.M., Sobol, I., Chan, H.M., 2011. Mercury hair concentrations and dietary exposure among Inuit preschool children in Nunavut, Canada. *Environment International*, 37(1): 42-48.
- Tsubaki, T., Irukayama, K., 1977. Minamata disease. Methylmercury poisoning in Minamata and Niigata, Japan. North-Holland Publishing Company, PO Box 211, Amsterdam, The Netherlands.
- Turro, N.J., 1983. Influence of nuclear spin on chemical reactions: magnetic isotope and magnetic field effects (a review). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(2): 609-621.
- Ullrich, S.M., Tanton, T.W., Abdrashitova, S.A., 2001. Mercury in the aquatic environment: a review of factors affecting methylation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 31(3): 241-293.
- UNEP, G.M.A., 2013. Sources, Emissions, Releases and Environmental Transport. UNEP Chemicals Branch G, Switzerland, editor.
- Urey, H.C., 1947. The thermodynamic properties of isotopic substances. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*: 562-581.
- Uthe, J.F., Solomon, J., Grift, B., 1972. Rapid semimicro method for the determination of methyl mercury in fish tissue. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 55(3): 583-589.

- Vahter, M. et al., 2000. Longitudinal study of methylmercury and inorganic mercury in blood and urine of pregnant and lactating women, as well as in umbilical cord blood. *Environmental Research*, 84(2): 186-194.
- Valley, J.W., Cole, D.R., 2001. *Stable isotope geochemistry*. Mineralogical Society of America.
- Van Oostdam, J. et al., 2005. Human health implications of environmental contaminants in Arctic Canada: A review. *Science of The Total Environment*, 351–352(0): 165-246.
- Vanhaecke, F., Balcaen, L., Malinovsky, D., 2009. Use of single-collector and multi-collector ICP-mass spectrometry for isotopic analysis. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 24(7): 863-886.
- Varekamp, J.C., Buseck, P.R., 1986. Global mercury flux from volcanic and geothermal sources. *Applied Geochemistry*, 1(1): 65-73.
- Vorkamp, K., Rigét, F.F., Bossi, R., Dietz, R., 2011. Temporal Trends of Hexabromocyclododecane, Polybrominated Diphenyl Ethers and Polychlorinated Biphenyls in Ringed Seals from East Greenland. *Environmental Science & Technology*, 45(4): 1243-1249.
- Wagemann, R., Innes, S., Richard, P.R., 1996. Overview and regional and temporal differences of heavy metals in Arctic whales and ringed seals in the Canadian Arctic. *Science of The Total Environment*, 186(1–2): 41-66.
- Wagemann, R., Trebacz, E., Boila, G., Lockhart, W.L., 1998. Methylmercury and total mercury in tissues of arctic marine mammals. *Science of The Total Environment*, 218(1): 19-31.
- Wagemann, R., Trebacz, E., Boila, G., Lockhart, W.L., 2000. Mercury species in the liver of ringed seals. *Science of The Total Environment*, 261(1–3): 21-32.
- Watras, C. et al., 1998. Bioaccumulation of mercury in pelagic freshwater food webs. *Science of The Total Environment*, 219(2): 183-208.
- Weslawski, J.M., Ryg, M., Smith, T.G., Oritsland, N.A., 1994. Diet of ringed seals (*Phoca hispida*) in a fjord of West Svalbard. *Arctic*, 47(2): 109-114.
- Whalin, L., Kim, E.-H., Mason, R., 2007. Factors influencing the oxidation, reduction, methylation and demethylation of mercury species in coastal waters. *Marine Chemistry*, 107(3): 278-294.
- Whalin, L.M., Mason, R.P., 2006. A new method for the investigation of mercury redox chemistry in natural waters utilizing deflatable Teflon[®] bags and additions of isotopically labeled mercury. *Analytica Chimica Acta*, 558(1): 211-221.
- WHO, 1990. *IPCS Environmental Health Criteria 101: Methylmercury*. International Programme of Chemical Safety. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WHO, 2008. “Guidance for Identifying Populations at Risk from Mercury Exposure,” UNEP DTIE Chemicals Branch and WHO Department of Food Safety, Zoonoses, and Foodborne Diseases. p. 4.
- Wiederhold, J.G. et al., 2010. Equilibrium mercury isotope fractionation between dissolved Hg (II) species and thiol-bound Hg. *Environmental Science & Technology*, 44(11): 4191-4197.
- Woshner, V.M., O'Hara, T.M., Bratton, G.R., Suydam, R.S., Beasley, V.R., 2001. Concentrations and interactions of selected essential and non-essential elements in bowhead and beluga whales of Arctic Alaska. *Journal of Wildlife Diseases*, 37(4): 693-710.
- Wright, D.R., Hamilton, R., 1982. Release of methyl mercury from sediments: effects of mercury concentration, low temperature, and nutrient addition. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39(11): 1459-1466.
- Yang, L., Sturgeon, R., 2009. Isotopic fractionation of mercury induced by reduction and ethylation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(1): 377-385.

- Yin, R., Feng, X., Shi, W., 2010. Application of the stable-isotope system to the study of sources and fate of Hg in the environment: A review. *Applied Geochemistry*, 25(10): 1467-1477.
- Yin, R. et al., 2013. Mercury speciation and mercury isotope fractionation during ore roasting process and their implication to source identification of downstream sediment in the Wanshan mercury mining area, SW China. *Chemical Geology*, 336(0): 72-79.
- Young, E.D., Galy, A., Nagahara, H., 2002. Kinetic and equilibrium mass-dependent isotope fractionation laws in nature and their geochemical and cosmochemical significance. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 66(6): 1095-1104.
- Zambardi, T., 2011. Recherche de marqueurs de processus de formation des planètes à travers les isotopes stables de masse moyenne, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.
- Zambardi, T., Sonke, J., Toutain, J., Sortino, F., Shinohara, H., 2009. Mercury emissions and stable isotopic compositions at Vulcano Island (Italy). *Earth and Planetary Science Letters*, 277(1): 236-243.
- Zhang, H., 2006. Photochemical redox reactions of mercury, *Recent Developments in Mercury Science*. Springer, pp. 37-79.
- Zhang, H., Lindberg, S.E., 2001. Sunlight and iron (III)-induced photochemical production of dissolved gaseous mercury in freshwater. *Environmental Science & Technology*, 35(5): 928-935.
- Zhang, T., Hsu-Kim, H., 2010. Photolytic degradation of methylmercury enhanced by binding to natural organic ligands. *Nature geoscience*, 3(7): 473-476.
- Zheng, W., Foucher, D., Hintelmann, H., 2007. Mercury isotope fractionation during volatilization of Hg(0) from solution into the gas phase. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 22(9): 1097-1104.
- Zheng, W., Hintelmann, H., 2009. Mercury isotope fractionation during photoreduction in natural water is controlled by its Hg/DOC ratio. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 73(22): 6704-6715.
- Zheng, W., Hintelmann, H., 2010a. Isotope fractionation of mercury during its photochemical reduction by low-molecular-weight organic compounds. *The Journal of Physical Chemistry A*, 114(12): 4246-4253.
- Zheng, W., Hintelmann, H., 2010b. Nuclear field shift effect in isotope fractionation of mercury during abiotic reduction in the absence of light. *The Journal of Physical Chemistry A*, 114(12): 4238-4245.
- Zillioux, E., Newman, J., 2003. Bioindicators- Essential Tools for Realistic Site Assessment and Remediation Cost Control. *SOILS, SEDIMENTS, AND WATER*.

Annexes

Table S1 : Exemples de limites ou recommandations pour les concentrations en Hg dans les poissons de différents pays. Modifié de ((UNEP), 2002)

Pays/ Organisation	Type de poisson	Maximums recommandés (poids humide)	Contrôles	Niveaux d'ingestion tolérables
Australie	Poissons connus pour contenir des niveaux élevés de mercure, comme l'espadon, le thon rouge du sud, le requin	1.0 mg Hg/kg	The Australian Food Standards Code	Dose hebdomadaire tolérable: 2,8 mg Hg / kg de poids corporel par semaine pour les femmes enceintes.
	Toutes les autres espèces de poissons et de crustacés et de mollusques	0.5 mg Hg/kg		
Canada	Tous les poissons sauf requin, l'espadon ou le thon frais ou congelé (exprimés en mercure total dans la partie comestible du poisson)	0.5 mg Hg/kg	Guidelines/ Tolerances of Various Chemical Contaminants in Canada	Dose journalière tolérable: 0,47 ug Hg / kg de poids corporel par jour pour la plupart de la population et 0,2 ug Hg / kg de poids corporel par jour pour les femmes en âge de procréer et les jeunes enfants
	Limite maximale autorisée pour les personnes qui consomment de grandes quantités de poissons, comme les Autochtones	0.2 mg Hg/kg		
Chine	Poissons d'eau douce	0.30 mg/kg	Sanitation standards for food	
Croatie	Poissons d'eau douce Prédateurs (thon, espadon, mollusques, crustacés)	1.0 mg Hg/kg 0.8 mg methylHg/kg	Rules on quantities of pesticides, toxins, mycotoxins, metals and histamines and similar substances that can be found in the food	
	Autres espèces de poissons	0.5 mg Hg/kg 0.4 mg methylHg/kg		
	Conserves de poisson Predatory fish Prédateurs (thon, espadon, mollusques, crustacés)	1.5 mg Hg/kg 1.0 mg methylHg/kg		
	Autres espèces de poissons	0.8 mg Hg/kg 0.5 mg methylHg/kg		
Communauté Européenne	Produits de la pêche, à l'exception de ceux qui sont énumérés ci-dessous. Baudroie, loup de l'Atlantique, la lingue bleue, la bonite, anguille, flétan, petit thon, le marlin, le brochet, palomette, requin portugais, rayons, le sébaste, les poissons de voile, de sabre, le requin (toutes les espèces), escolier, esturgeon, l'espadon et le thon.	0.5 mg Hg/kg 1 mg Hg/kg	Various Commission decisions, regulations and Directives	
Géorgie	Poisson (eau douce) et produits de la pêche	0.3 mg Hg/kg	Georgian Food Quality Standards 2001	
	Poisson (Mer Noire)	0.5 mg Hg/kg		
	Caviar	0.2 mg Hg/kg		
Inde	Poisson	0.5 ppm total Hg	Tolerance Guidelines	
Japon	Poisson	0.3 mg total Hg/kg 0.3 mg Hg/kg methylHg	Food Sanitation Law - Provisional regulatory standard for fish and shellfish	Dose tolérable hebdomadaire: 0,17 mg methylHg (0,4 mg / kg de poids corporel par jour)(Nakagawa et al., 1997)
République de Corée	Poisson	0.5 mg Hg/kg	Food Act 2000	
Ile Maurice	Poisson	1 ppm Hg	Food Act 2000	
Philippines	Poissons (hors prédateurs) Prédateurs	0.5 mg methylHg /kg 1 mg methylHg/kg	Codex Alimentarius	
Slovaquie	Poisson d'eau douce hors prédateurs	0.1 mg total Hg/kg	Slovak Food Code	
	Poissons d'eau douce (prédateurs)	0.5 mg total Hg/kg		

Annexes

Pays/ Organisation	Type de poisson	Maximums recommandés (poids humide)	Contrôles	Niveaux d'ingestion tolérables
	Poissons marins hors prédateurs	0.5 mg total Hg/kg		
	Poissons marins (prédateurs)	1.0 mg total Hg/kg		
Thaïlande	Fruits de mer Autres nouritures	0.5 µg Hg/g 0.02 µg Hg/g	Food Containing Contaminant Standard	
Grande Bretagne	Poisson	0.3 mg Hg/kg (wet flesh)	European Statutory Standard	
Etats-Unis	Poissons, crustacés et autres animaux aquatiques Les états, les tribus et les territoires sont responsables du conseil de la consommation de poissons pêchés localement. Ci-contre, le niveau de déclenchement pour de nombreux services de santé de l'Etat.	1 ppm methylHg 0.5 ppm methylHg	FDA action level Controles locaux	US EPA reference dose: 0.1 µg methylHg/kg de poids corporel par jour
WHO/FAO	Tous les poissons hors prédateurs Prédateurs	0.5 mg methylHg/kg 1 mg methylHg/kg	FAO/WHO Codex Alimentarius guideline level	Dose hebdomadaire tolérable provisoire: 3,3 ug methylHg / kg de poids corporel par semaine

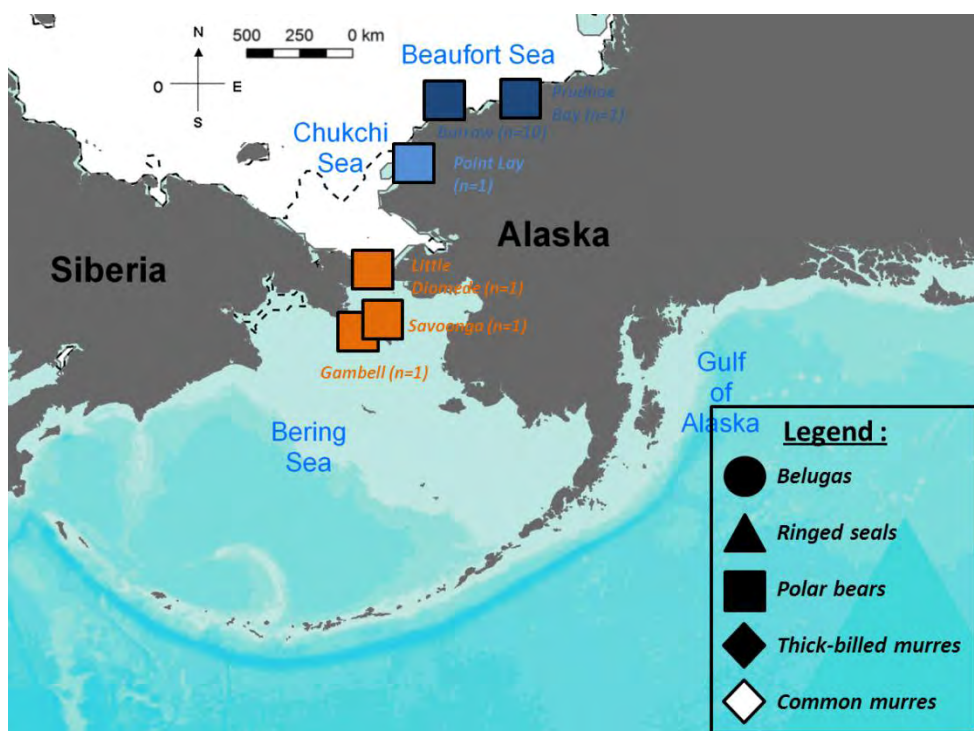
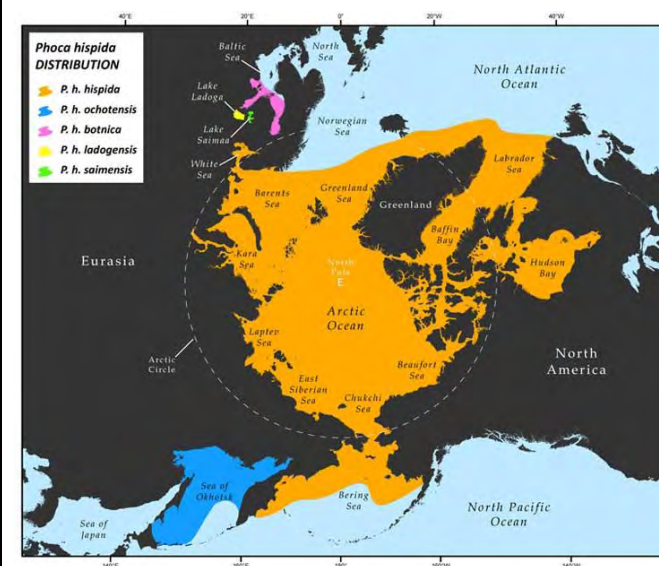


Figure S1 : Carte de distribution des ours polaires (*Ursus Maritimus*) étudiés dans cette thèse

Table S2 : Description générale du phoque annelé (Source photographie : www.npolar.no). Carte : Distribution des cinq sous-espèces de phoques annelés (source : (Kelly et al., 2010b))

Description générale		
Ordre/Famille	Carnivora/Phocidae	Maturité sexuelle 5-6 ans
Genre/Espèce	Phoca/Hispida	Nombre et recensement en Arctique
Poids	Moyenne 50-70 kg	Nombre : de 250000 à 1 million
Longueur	Moyenne 1.5 mètres	
Espérance de vie	25-30 ans (Frost and Lowry, 1981)	Non recensée comme « en voies d’extinction » ni « en danger » selon le « Endangered Species Act ». Cependant elle est listée dans la catégorie « menacée » et sa population décroît selon le « Marine Mammal Protection Act ». Globalement, cette espèce a été classée à faible risques dans la « IUCN Red List ».
Apparence	Manteau foncé avec des anneaux argentés sur le dos et sur les côtés. Le ventre est complètement argenté. Ils ont une petite tête, un museau court, des griffes sur leurs nageoires antérieures, et un corps dodu	
Comportement	→ Animaux solitaires → Leur mode de vie est étroitement lié à la couverture de glace. Excepté durant la mue printanière (Mai-Juin), les phoques passent la plupart de leur temps (>80% du temps) dans l’eau sous la glace, le reste du temps ils se cachent dans des petites tanières sur la glace (Kelly et al., 2010a; Smith and Stirling, 1975). Ils utilisent leurs griffes pour maintenir les trous dans la glace pour respirer. Ce sont les seuls phoques à maintenir ces trous de respiration dans la glace côtière (« landfast ice »).	
Distribution	Circumpolaire	
Position dans la chaîne trophique Arctique : Proies/prédateurs	Le phoque annelé est une espèce très opportuniste qui mange une grande variété de proies situées à différents niveaux trophiques. Les proies préférées sont petites et forment des bancs (Kovacs, 2007). Le plus souvent ce sont des crustacés de 2 à 6 cm et des poissons de 5 à 10cm (Weslawski et al., 1994). Dans une review, Kelly et al dénombrent plus de 200 espèces de poissons/crustacés/amphipodes retrouvés dans les contenus stomacaux des phoques. Il apparaît que les espèces les plus consommées en Alaska soit les morues (<i>Arctic/Polar/Safron Cod</i>) et les crevettes ou krill (<i>Mysidacea, Euphausiacea</i>) (Kelly et al., 2010b). Une variabilité saisonnière a été observée avec une consommation plus importante de poissons durant l’hiver lorsque le besoin en graisse est important, alors que les invertébrés sont plus consommés pendant la saison d’eau libre (Kovacs, 2007; Smith, 1987). D’autre part, certaines études ont montré que les juvéniles mangeaient plus de crustacés et/ou moins de poissons comparés aux adultes (Smith, 1987). Côté prédation, les phoques annelés sont les proies les plus fréquentes des ours polaires et ces derniers peuvent tuer un phoque tous les 2 à 6 jours. Cependant, les phoques annelés peuvent aussi être les proies de morses ou orques.	



Annexes

Table S3 : Comparaisons régionales des concentrations en Hg total (HgT) dans les foies de phoques annelés (Pusa hispida)

Régions	n	Lieu de prélèvement	Date de prélèvement	Age Moyenne ou amplitude	Moyenne [HgT]	Incertitude	Reference
Alaska	10	Barrow-Nome Alaska	1988-1991	1-2 ans	2.24	2.11	(Becker et al., 1995)
	5	Barrow, Alaska	1995-1997	0-5 ans	0.73	0.65	(Riget et al., 2005)
	11	Barrow, Alaska	1995-1997	> 5 ans	4.78	5.72	(Riget et al., 2005)
	64	Barrow, Alaska		6.6	2.47	3.15	(Dehn et al., 2006)
Moyenne	Alaska	90	Alaska	1988-1997	-	2.56	1.67
Ouest Canadien	15	Sachs Harbour, Canada	2001	0-5 ans	19.20	23.26	(Riget et al., 2005)
	5	Sachs Harbour, Canada	2001	> 5 ans	19.10	9.6	(Riget et al., 2005)
	2	Holman, Canada	2001	0-5 ans	19.60	10	(Riget et al., 2005)
	18	Holman, Canada	2001	> 5 ans	29.90	26.5	(Riget et al., 2005)
	25	Holman, Canada		11	22.65	17.54	(Dehn et al., 2006)
	145	Western Canadian Arctic	1987-1994	7.4	32.90	35.2	(Wagemann et al., 1996)
Moyenne	Ouest Canadien	210	Western Canada	1987-2001	-	23.89	6.04
Est Canadien	5	Arctic Bay, Canada	2000	0-5 ans	7.42	7.11	(Riget et al., 2005)
	17	Arctic Bay, Canada	2000	> 5 ans	12.40	14.4	(Riget et al., 2005)
	2	Grise Fiord, Canada	1998	0-5 ans	19.60	10	(Riget et al., 2005)
	18	Grise Fiord, Canada	1998	> 5 ans	29.90	26.5	(Riget et al., 2005)
	16	Pont Inlet, Canada	2000	0-5 ans	6.84	16.9	(Riget et al., 2005)
	7	Pont Inlet, Canada	2000	> 5 ans	14.90	9.8	(Riget et al., 2005)
	115	Eastern Canadian Arctic	1992-1994	6.1	8.34	7.03	(Wagemann et al., 1996)
Moyenne	Est Canadien	180	Eastern Canada	1992-2000	-	14.20	8.31
Nord-Ouest Groenland	22	NWGreenland	1984-1985	1	0.71	2	(Dietz et al., 1996)
	10	NWGreenland	1984-1985	Entre 2 et 4 ans	1.58	1.38	(Dietz et al., 1996)
	14	NWGreenland	1984-1985	entre 5et 10 ans	2.96	2.24	(Dietz et al., 1996)
	12	Avanersuaq, Greenland	1998	0-5 ans	4.59	4.2	(Riget et al., 2005)
	8	Avanersuaq, Greenland	1998	sup à 5 ans	9.15	6.58	(Riget et al., 2005)
Centre-Ouest Groenland	10	CWGreenland	1978-1987	1	0.51	1.51	(Dietz et al., 1996)
Sud-Ouest Groenland	10	SWGGreenland	1986	1	0.95	1.41	(Dietz et al., 1996)
	32	Qeqertarsuaq, Greenland	1999-2000	0-5 ans	1.23	2.66	(Riget et al., 2005))
	3	Qeqertarsuaq, Greenland	1999-2000	sup à 5 ans	2.91	2.03	(Riget et al., 2005)
Centre-Est Groenland	8	CEGreenland	1985-1991	1	1.40	1.41	(Dietz et al., 1996)
	24	CEGreenland	1985-1991	2-4 ans	2.79	1.82	(Dietz et al., 1996)
	26	CEGreenland	1985-1991	5-10 ans	7.57	2.27	(Dietz et al., 1996)
		CEGreenland	1985-1991	10-15 ans	19.90	3.94	(Dietz et al., 1996)
	24	Ittoqqortoormiit, Greenland	1999-2000	0-5 ans	4.78	4.35	(Riget et al., 2005)
	14	Ittoqqortoormiit, Greenland	1999-2000	sup à 5 ans	7.96	5.08	(Riget et al., 2005)

Annexes

Moyenne	Groenland	217	Groenland	1978-2000	-	4.60	5.07	
	Lac Lagoda, Russie	21	Lake Lagoda, Russia			35.40	49.15	(Medvedev et al., 1997)
		14	White Sea, Russia			4.20	11.9	(Medvedev et al., 1997)
	Mer Blanche Russie	8	White Sea, Russia	2001	0-5 ans	1.87	1.44	(Riget et al., 2005)
		11	White Sea, Russia	2001	sup à 5 ans	2.41	2.78	(Riget et al., 2005)
Moyenne	Mer Blanche Russie	54	Russie	2001	-	2.83	1.22	
	Svalbard	7	Svalbard, Norway	1996	0-5 ans	0.64	0.317	(Riget et al., 2005)
		10	Svalbard, Norway	1996	sup à 5 ans	1.19	0.74	(Riget et al., 2005)
Moyenne	Svalbard	17	Svalbard, Norway	1996	-	0.92	0.39	

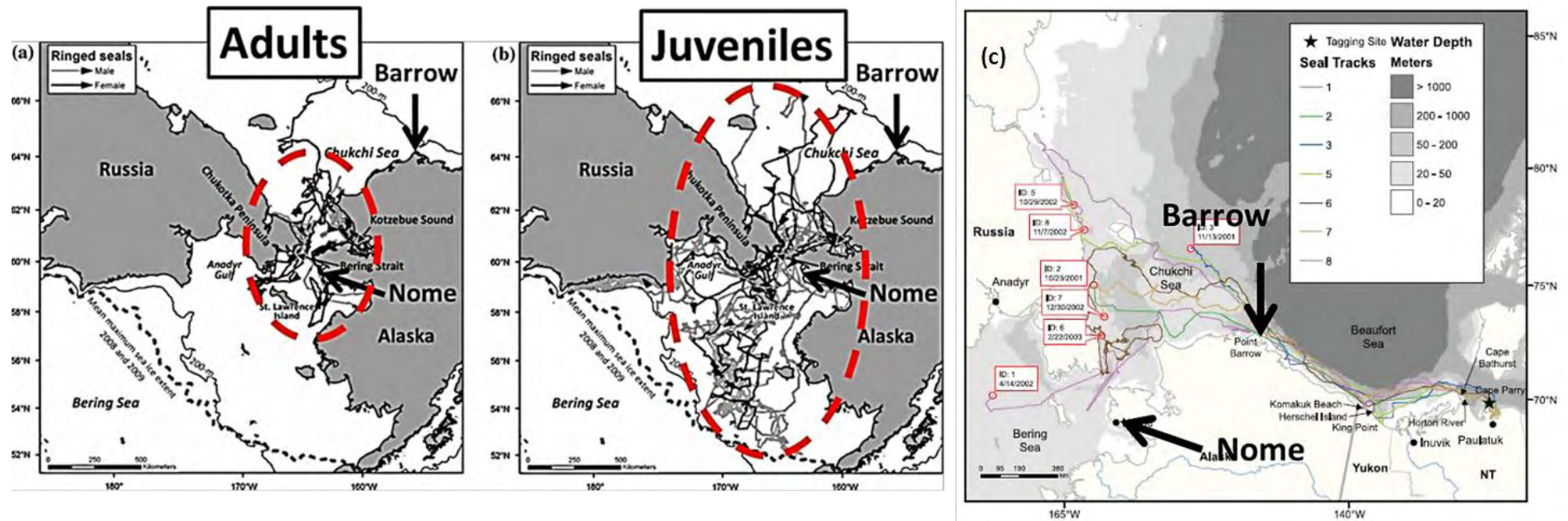


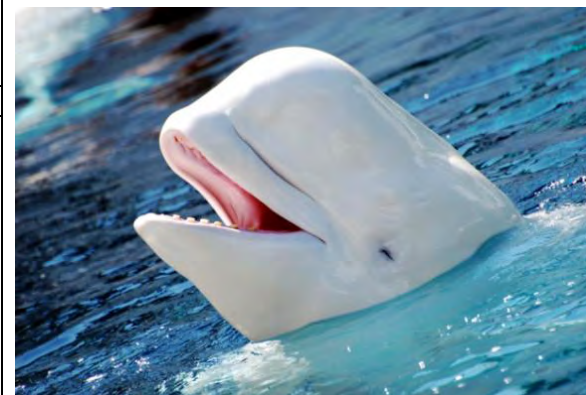
Figure S2 : a) Mouvements de 11 phoques annelés adultes (7 males et 4 femelles) déterminés par pose de balises satellites à Kotzebue Sound en Octobre 2007 et 2008. Durée de transmission : 40-277 jours (moyenne=118 jours).

b) Mouvements de 14 phoques annelés juvéniles (9 males et 5 femelle) déterminés par pose de balises satellites à Kotzebue Sound en Octobre 2007 et 2008. Durée de transmission : 17-297 jours (moyenne=156 jours). Modifié de (Crawford et al., 2012).

c) Carte représentant les déplacements de 8 phoques annelés obtenue par pose de balises satellites à Cape Perry. Tous les individus sont des juvéniles excepté le n°1. Modifiée de (Harwood et al., 2012)

Table S4: Description générale de la baleine beluga. D'après <http://www.nmfs.noaa.gov/>. Photographie Crédit : Steve Snodgrass. Carte montrant la répartition annuelle du béluga en jaune, et les zones d'agrégation estivale en rayées. D'après (Reeves et al., 2014).

Description générale			
Ordre/Sous Ordre/Famille	Cetacea/Odontoceti/Monotidae	Maturité sexuelle	Female ≈4-9 ans Male ≈4-7 ans (Suydam, 2009)
Genre/Espèce	Delphinapterus/Leucas	Nombre et recensement	
Poids	Moyenne 1430 kg	→Il est difficile d'estimer le nombre de beluga présent en Arctique du fait de leur grande mobilité. →Globalement Il apparaît que leur population reste stable et même croît dans certaines régions (Bristol Bay, +4%). Cependant les belugas vivant dans le Cook Inlet inquiètent. Sur les 1000 individus présents initialement, leur chasse intensive entre 1994 et 1998 a engendré la perte de 347 individus (Frost and Lowry, 1990). En 2000, cette population a été classée comme « en danger » et « depleted » par le « Marine Mammal Protection Act ». L'arrêt de la chasse intensive permet de reconstituer petit à petit le stock initial.	
Longueur	Moyenne 4 mètres mais peut atteindre 5 mètres		
Espérance de vie	35-50 ans		
Apparence	Petit et blanc, manque une nageoire dorsale, généralement ne "souffle" pas à la surface lors de la respiration		
Comportement	Animaux très sociaux qui migrent généralement, qui chassent, et interagissent ensemble dans des groupes de 10 à plusieurs centaines d'individus.		
Distribution	→Contrairement aux phoques, les belugas ont une distribution polaire discontinue (Figure ci-contre). L'été, on les retrouve essentiellement dans les environnements très limités, essentiellement les côtes du nord du Canada, de la Russie et de l'Alaska. L'hiver, leur distribution est plus large et ils rejoignent le Groenland et le golfe de la mer de Béring. →Présence de stocks.		
Position dans la chaîne trophique Arctique : Proies/prédateurs	<p>→La nourriture du beluga en hiver est inconnue.</p> <p>→L'été, tout comme les phoques annelés, le beluga est une espèce opportuniste mangeant une grande variété de proies (poissons, crevettes, poulpes...). Tout comme chez le phoque annelé, la morue (« Polar/Arctic cod ») est supposée être la principale proie (Heide-Jørgensen and Teilmann, 1994), avec une prédominance du saumon du pacifique (<i>Oncorhynchus spp.</i>) pour les belugas d'Alaska (Frost). De nombreuses proies d'eau douce comme certaines truites (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) ou des lottes (<i>Lota lota</i>) peuvent aussi se retrouver dans certains estomacs (Huntington, 2002). Ainsi, bien que la majeure partie de l'alimentation se fasse sur le plateau continental ou dans les estuaires, les rivières/fleuves peuvent être aussi des lieux de chasse pour les belugas.</p> <p>→Les belugas ont peu de prédateurs naturels. Les orques (<i>Orcinus orca</i>) et les ours polaires (<i>Ursus maritimus</i>) peuvent se nourrir exceptionnellement de très jeunes belugas.</p>		



Annexes

*Table S5 : Comparaisons régionales des concentrations en Hg total (HgT) dans les foies de baleines beluga (*Delphinapterus leucas*)*

Région	n	Lieu de prélèvement	Date Prélèvement	Age Moyenne ou amplitude	Moyenne [HgT] ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Incertitude ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Référence
Alaska	11	Alaska (Point Hope, Point lay, Cook Inlet)	1989-1992	24.4	30.67	27.78	(Becker et al., 1995)
	24	Alaska	1983-1997		23.29	25.93	(Woshner et al., 2001)
	48	Point Hope, Alaska			15.95	15.17	(Dehn et al., 2006)
	6	Cook Inlet	1992-1996		5.45	3.47	(Becker et al., 2000)
	4	Cook Inlet	1992-1997		2.57	1.82	(Becker et al., 2000)
Moyenne	93	Alaska	1983-1997	-	15.59	11.82	
Est Arctique Canadien	341	Eastern Arctic Canada	1984-2002	11.65	10.54	7.16	(Lockhart et al., 2005)
	139	Eastern Arctic	1984-1994		8.40	8.25	(Wagemann et al., 1996)
Moyenne	480	Est Arctique Canadien	1984-2002	-	9.47	1.51	
Ouest Arctique Canadien	149	Western Arctic, Canada	1981-2002	16.07	24.28	14.71	(Lockhart et al., 2005)
	77	Western Arctic	1993-1994		27.10	24.70	(Wagemann et al., 1996)
	32	East Beaufort Sea	2004-2005	29±2	31.40	5	(Loseto et al., 2008)
	10	East Beaufort Sea	2005	18±3	4.50	7.7	(Loseto et al., 2008)
	Moyenne	268	Ouest Arctique Canadien	1981-2005	-	21.82	11.91
Ouest Groenland	14	West Greenland	1980	0-6	Range 0.39-1.02		(Hansen et al., 1990)
	4	West Greenland	1980	6-13 ans	Range 1.31-2.96		(Hansen et al., 1990)
	5	West Greenland	1980	14 ans et +	Range 2.99-16.4		(Hansen et al., 1990)
	16	NWGreenland	1985	0-6	0.80	2.22	(Dietz et al., 1996)
	12	NWGreenland	1985	7-13 ans	2.38	1.6	(Dietz et al., 1996)
Moyenne	28	Groenland	1985	-	1.59	1.12	

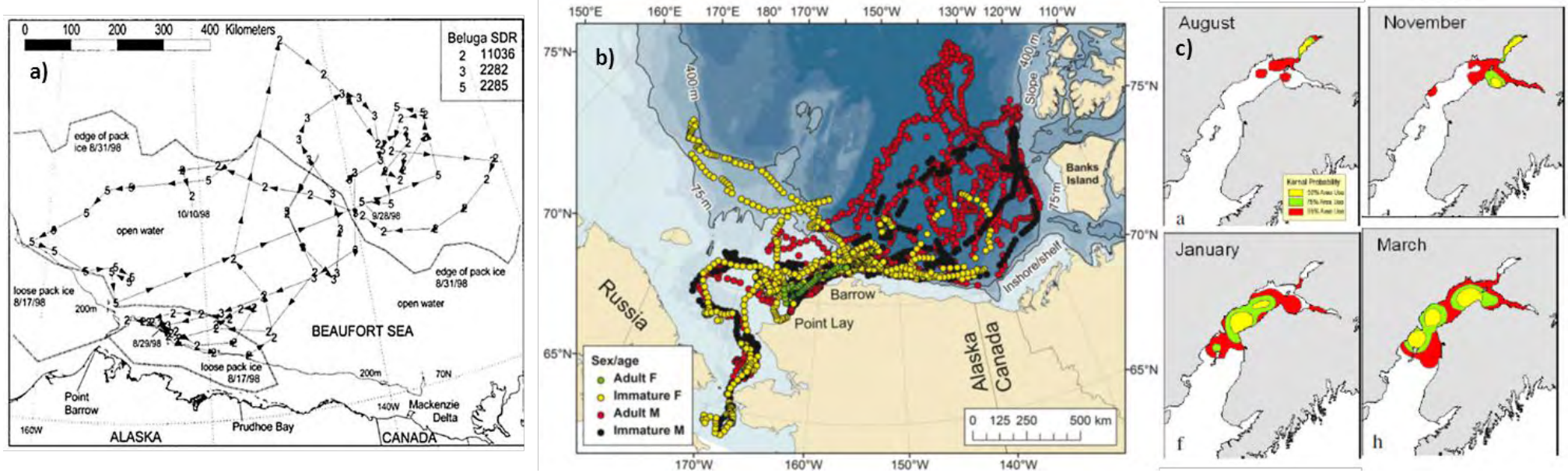


Figure S3 : a) Mouvements de 3 baleines belugas capturées à Point Lay entre le 19 Aout et le 10 Octobre 1998. D'après (Suydam et al., 2001)

b) Mouvements de 23 baleines belugas déterminés par pose de balise satellites à Point Lay entre 1998-2002. D'après (Citta et al., 2013)

c) Probabilité de Kernel estimés par mois de l'utilisation du Cook Inlet par les belugas suivis par satellites. Les différentes probabilités de 95%, 75% et 50% sont représentées en rouge, vert et jaune respectivement. D'après (Hobbs et al., 2005).

Table S6 : Description générale de l'Ursus Maritimus. D'après (DeMaster and Stirling, 1981). Photographie d'un ours polaire à Svalbard (Norvège).

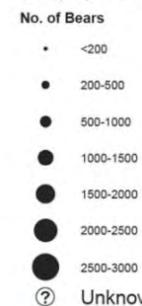
Crédit : WWF. Distribution géographique et tendances dans la population d'Ursus Maritimus en région Arctique. Crédits : WWF

Description générale			
Ordre/Famille	Carnivora/Ursidae	Maturité sexuelle	≈4-5 ans
Genre/Espèce	Ursus/Maritimus	Nombre et recensement	
Poids	Moyenne 300-800 kg pour les mâles et 150-300 kg pour les femelles	→Nombre : 20000 à 25000 selon «IUCN/SSC Polar Bear Specialist Group » (Schliebe et al., 2008). →Recensement : Classés comme « à risque », « en danger » et « en décroissance de population » par le « Marine Mammal Protection Act ».	
Longueur	Moyenne 1.8-2.0 mètres		
Espérance de vie	25-30 ans		
Apparence	La couleur de la fourrure dépend de la période de l'année, passant d'un blanc pur juste après la mue à une nuance jaunâtre/brune en été probablement due à une oxydation par le soleil.		
Comportement	Animaux solitaires. L'ours polaire est souvent considéré comme un mammifère marin tellement il passe la plupart de son temps sur ou dans l'eau. Cependant ses membres inférieurs et ses pattes lui permettent de parcourir des kilomètres sur les terres ou la glace (Perrin et al., 2009).		
Distribution	Circumpolaire. L'habitat de l'ours polaire est en fait guidé par celui de sa principale proie le phoque annelé. En effet, à de rare exception près, l'ours se nourrit exclusivement de phoques annelés (Smith, 1980). On retrouve donc le même habitat chez les deux espèces. En Alaska, on le retrouvera donc comme le phoque dans des zones peu profondes (plateau continental), côtières ou proches d'archipels d'îles. On retrouve aussi le mouvement latitudinal entre l'hiver ou il étend son espace de vie jusqu'au sud de la mer de Béring et l'été où il suit le front de glace vers le Nord (Garner et al., 1990).		
Position dans la chaîne trophique Arctique : Proies/prédateurs	Les ours polaires sont les mammifères les plus hauts dans la chaîne alimentaire de l'Arctique. Ils se nourrissent principalement et quasi exclusivement de phoques annelés (Derocher et al., 2002).		

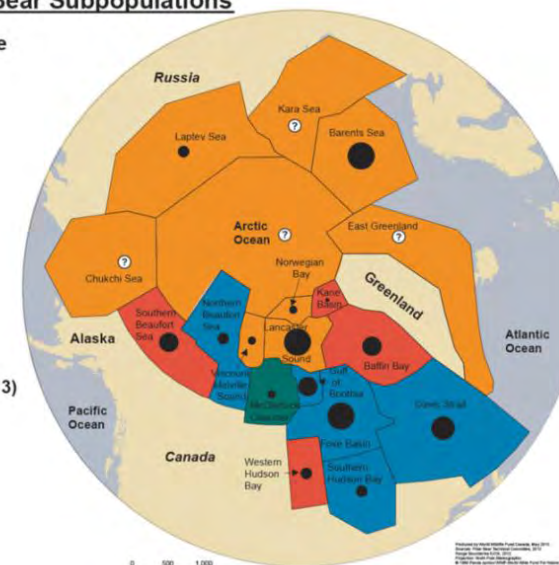


Trends in Polar Bear Subpopulations

Subpopulation size



Population Trend (2013)



Annexes

Table S7 : Comparaisons régionales des concentrations en Hg total (HgT) dans les foies d'ours polaires (Ursus Maritimus)

Région	n	Lieu de prélèvement	Date Prélèvement	Age Moyenne ou amplitude	Moyenne [HgT] ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Incertitude ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Référence
Alaska	6	Alaska	1994-1999	5-19 ans	10.36	9.14	(Rush et al., 2008)
	26	Barrow, Alaska		10.6±8.7	14.01	12.53	(Dehn et al., 2006)
	32	Alaska	1983-1999	-	12.19	2.58	
Est Arctique Canadien	13	East Baffin Island, Canada	2002	2-18 ans	28.43	11.05	(Rush et al., 2008)
	13	Lancaster Sound, Canada	2002	5-14 ans	45.24	11.05	(Rush et al., 2008)
	12	Northern Baffin bay, Canada	2002	5-13 ans	32.48	11.2	(Rush et al., 2008)
	11	Southeast Hudson Bay	2002	3-7 ans	7.34	11.37	(Rush et al., 2008)
	23	Est Arctique Canadien	2002	-	28.37	15.75	
Ouest Arctique Canadien	11	Southeast Beaufort Sea	2002	3-24 ans	62.49	11.37	(Rush et al., 2008)
Groenland	28	NWGreenland	1988-1990	2-6 ans	12.60	1.6	(Dietz et al., 1996)
	8	NWGreenland	1988-1990	sup à 7 ans	21.60	1.26	(Dietz et al., 1996)
	28	CEGreenland	1984-1990	2-6 ans	7.16	1.51	(Dietz et al., 1996)
	21	CEGreenland	1984-1990	sup à 7 ans	10.30	2.08	(Dietz et al., 1996)
	12	NWGreenland	1988-1990	2-6 ans	12.40	1.11	(Dietz et al., 2000)
	3	NWGreenland	1988-1990	sup à 7 ans	21.00	1.14	(Dietz et al., 2000)
	6	NWGreenland	1988-1990	1	4.25	1.47	(Dietz et al., 2000)
	14	NWGreenland	1988-1990	2-6 ans	12.90	1.16	(Dietz et al., 2000)
	5	NWGreenland	1988-1990	sup à 7 ans	22.00	1.12	(Dietz et al., 2000)
	1	CEGreenland	1983-1990	1	2.99		(Dietz et al., 2000)
	8	CEGreenland	1983-1990	2-6 ans	7.09	1.14	(Dietz et al., 2000)
	8	CEGreenland	1983-1990	sup à 7 ans	6.68	1.29	(Dietz et al., 2000)
	4	CEGreenland	1983-1990	1	2.13	1.26	(Dietz et al., 2000)
	19	CEGreenland	1983-1990	2-6 ans	7.52	1.1	(Dietz et al., 2000)
	13	CEGreenland	1983-1990	sup à 7 ans	13.40	1.19	(Dietz et al., 2000)
	46	Greenland	1988-1990	1-16 ans	13.00	9.14	(Rush et al., 2008)
82	Greenland	1983-2000	2-23 ans	11.43	9.94	(Rush et al., 2008)	
	12 8	Groenland	1983-2000	-	11.09	6.13	
Norvège	16	Norway	1978-1989		2.60	2.00	(Norheim et al., 1992)
	6	Norway	1978-1989		1.90	1.30	(Norheim et al., 1992)
	22	Norvège	1978-1990	-	2.25	0.49	

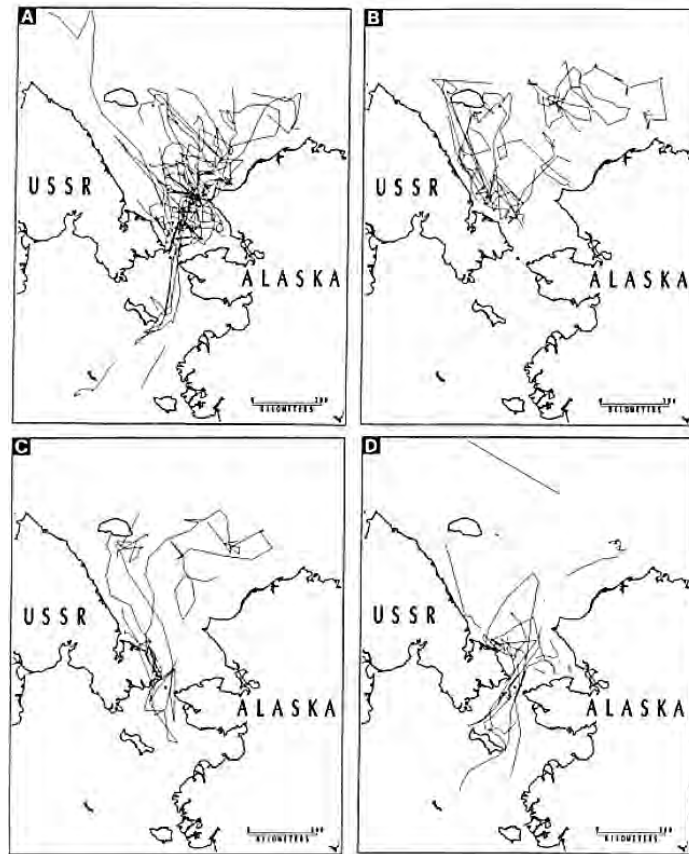


Figure S4 : Mouvements de 20 ours polaires déterminés par télémétrie satellite dans les mers de Béring et de Chukchi. a) Printemps (Avril-May 1986-1988), b) Eté (Juin-Sept, 1986-1987), c) Automne (Octobre-Décembre, 1986-1987), d) Hiver (Janvier-Mars, 1987-1988). D'après (Garner et al., 1990).

A study of the metabolic, ecological and biogeochemical controls on Hg stable isotope fractionation in arctic marine mammals

Since the discovery of atmospheric Hg depletion events (AMDE) in the Arctic, the Polar Regions have become key in understanding the Hg global cycle. The impact of Hg on human health depends on both Hg concentration and chemical form. In particular, monomethylmercury (MMHg) is a potent neurotoxin. High MMHg concentrations are observed in Arctic top predators due to bioaccumulation and biomagnification processes in the food webs. Hence, the characterization of the transformations leading to the formation (methylation) and the degradation (demethylation) of MMHg is of great concern to assess its fate and impact in aquatic ecosystems. In this context, we present an environmental study on three Arctic bio-indicators: the ringed seal (*Pusa hispida*), the beluga whale (*Delphinapterus leucas*) and the polar bear (*Ursus maritimus*). Hg isotope analysis of the bio-indicator liver tissues show both mass dependent isotope fractionation (MDF, $\delta^{202}\text{Hg}$) and mass independent fractionation (MIF, $\Delta^{199}\text{Hg}$). While the changes in $\delta^{202}\text{Hg}$ are widely linked to in vivo metabolic processes, the time trend (1988-2002, *Pusa hispida*) and the latitudinal gradient (60°N-71°N, *Delphinapterus leucas*) observed for $\Delta^{199}\text{Hg}$ signatures suggests the influence of sea ice cover on the Arctic biogeochemical Hg cycle. In a second part of this dissertation, we propose a novel and promising molecular approach with the first measurements of the isotopic compositions of Hg and carbon on the MMHg molecule in biological samples. These results are very promising for tracing MMHg origin in aquatic environments.

Keywords : mercury, carbon, stable isotopes, mammals, Arctic, climate, geochemistry



Thèse de doctorat



Thèse présentée et soutenue par : *Jérémy Masbou*

Le : **22 octobre 2014**

Au **Laboratoire de Géosciences Environnement Toulouse, Université Toulouse III Paul Sabatier**

Sous la direction de : *David Point*, Chargé de recherche, IRD
Jeroen Sonke, Chargé de recherche, CNRS

Spécialité : **Biogéochimie isotopique**

Étude des processus métaboliques, écologiques et biogéochimiques contrôlant le fractionnement isotopique du Hg chez les mammifères marins de l'Arctique

Depuis la découverte de processus de dépôts massifs de Hg (AMDE), l'Arctique est devenue une région clé dans la compréhension du cycle global du Hg. L'impact sur la santé humaine de ce polluant dépend non seulement de sa concentration mais aussi et surtout de sa forme chimique. En particulier, le monométhylmercure (MMHg) est une puissante neurotoxine qui atteint des concentrations élevées chez les prédateurs de l'Arctique du fait de ses propriétés de bioaccumulation et de bioamplification dans la chaîne alimentaire. La compréhension des mécanismes à l'origine de la formation du MMHg (méthylation) et de sa dégradation (déméthylation) est primordiale pour caractériser son devenir et son impact dans les milieux aquatiques.

Nous présentons ici une étude environnementale effectuée sur des tissus biologiques prélevés sur trois espèces emblématiques de l'Arctique : le phoque annelé (*Pusa hispida*), la baleine beluga (*Delphinapterus leucas*) et l'ours polaire (*Ursus Maritimus*). L'analyse de leurs compositions isotopiques en Hg montre simultanément un fractionnement dépendant (MDF, $\delta^{202}\text{Hg}$) et indépendant de la masse (MIF, $\Delta^{199}\text{Hg}$). Alors que les variations en $\delta^{202}\text{Hg}$ semblent largement expliquées par des processus métaboliques internes de détoxification/accumulation, la tendance temporelle (1988-2002, *Pusa hispida*) et le gradient latitudinal (60°N-71°N, *Delphinapterus leucas*) observés pour le $\Delta^{199}\text{Hg}$ reflètent vraisemblablement l'influence de l'évolution et de la distribution de la banquise sur le cycle biogéochimique du Hg en Arctique.

Dans la seconde partie de cette thèse de doctorat, nous développons une approche moléculaire novatrice et prometteuse permettant de déterminer pour la première fois la composition isotopique des atomes de Hg et de carbone contenus dans la molécule de MMHg pour les échantillons biologiques. Ces premières mesures offrent des perspectives prometteuses pour tracer l'origine du MMHg dans les milieux aquatiques.

Mots clés : mercure, carbone, isotopes stables, mammifères, Arctique, climat, géochimie



European Research Council

Géosciences Environnement Toulouse
14, avenue Edouard Belin
31400 Toulouse

