

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE BORDEAUX 1

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DU VIVANT, GEOSCIENCES,
SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

par

Olivier Champeau

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Spécialité : ECOTOXICOLOGIE

**BIOMARQUEURS D'EFFETS CHEZ C. FLUMINEA :
DU DEVELOPPEMENT EN LABORATOIRE
A L'APPLICATION EN MESOCOSME**

SOUTENUE LE 23 SEPTEMBRE 2005

Après avis de :

Mme Miren P. Cajaraville	Professeur à l'Université du Pays Basque, Bilbao
Mme Paule Vasseur	Professeur à l'Université de Metz

Devant la commission d'examen formée de :

Mme Miren P. Cajaraville	Professeur à l'Université du Pays Basque, Bilbao	Rapporteur
Mme Paule Vasseur	Professeur à l'Université de Metz	Rapporteur
Mme Anne Bassères	Ingénieur de Recherche Total Petrochemicals	Examineur
Mme Pierrette Cassand	Professeur à l'Université de Bordeaux 1	Présidente
M. Jean-François Narbonne	Professeur à l'Université de Bordeaux 1	Directeur de Thèse

*La transparence magnanime d'un mirage
salue les offrandes d'une cérémonie d'initiation*
Gabriel Okoundji
(« BONO – Le guetteur de signes » – 2005)

A ma famille,

Remerciements

Ce travail a été effectué dans le Groupe de Toxicologie Biochimique du Laboratoire de Physico-Toxicochimie des Systèmes Naturels (LPTC) à l'Université de Bordeaux 1, grâce au support financier du Groupe TOTAL PETROCHEMICALS.

Je remercie le Pr. Jean-François Narbonne, mon Directeur de thèse et responsable du Département de Toxicologie Biochimique, ainsi que le Dr. Philippe Garrigues, Directeur du Laboratoire et le Dr. Hélène Budzinski qui lui a succédé, pour m'avoir donné les moyens de mener ces travaux.

Je remercie également le Dr. Anne Bassères du Groupe TOTAL PETROCHEMICALS (Pôle de Recherche et Développement Mont/Lacq) pour m'avoir confié la réalisation de cette thèse et fait part de ses conseils. Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance.

Mme le Pr. Paule Vasseur a accepté de juger ce travail, qu'elle trouve ici l'expression de mes plus vifs remerciements.

Beaucoup de ces travaux ont été réalisés à l'Université du Pays Basque (UPV/EHU) à Bilbao, je tiens à exprimer toute ma gratitude au Pr. Miren Cajaraville qui a bien voulu m'y accueillir, et participer à ce jury en tant que rapporteur de cette thèse.

Lan honen atal bat Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) Zientzia eta Teknologia Fakultateko Biologia Zelularreko laborategian gauzatu da. M.P. Cajaraville irakasleari eskertu nahi nioke bere arreta eta laguntza, baita epaimahi honen partaide izatea ere.

Mes remerciements vont aussi au Pr. Pierrette Cassand qui a bien voulu participer à ce jury.

Je remercie également tous ceux qui ont permis la réalisation, de près ou de loin, de ce travail mais plus particulièrement :

Michel Auffret pour m'avoir accueilli au LEMAR et initié à l'immunotoxicité ainsi qu'à Sabrina pour son aide technique sur le cytomètre en flux.

Pr. P.D. Hansen et Dr. E. Unruh pour m'avoir appris une grande partie des techniques utilisées dans ce travail.

Nadine et Muriel, les techniciennes de l'équipe Indicateurs Biologiques du Dr A. Bassères, pour leur soutien et les bons moments lors des temps de prélèvement aux Rivières Pilotes.

Toutes les personnes présentes dans le Groupe Toxicologie Biochimique : Christelle, Michelle, Sylviane, Blandine, Bénédicte, Nadia.

Patrick, pour ses idées sur les mises en cages des animaux (et ses huîtres).

Merci à Damien et Sandrine qui m'ont aidé à mettre le pied au Pays Basque espagnol, ainsi qu'à tout le personnel et aux étudiants du Laboratoire du Pr. Cajaraville : Ionan, Manu, Ibon, Amaia, Amagoia, Arantza, Beñat, Eider, Izaskun, Larraitz, Maren, Nelva, Raphaël, Urtzi, Vega pour tous vos conseils et les bons moments, dont les Basques (Panaméen et Belge) ont le secret.

Que Thierry et Peggy soient assurés de ma profonde estime, non seulement pour m'avoir si souvent offert un toit, et parfois même au dernier moment, lors de mes passages à Pau, mais également pour leur amitié depuis le début de mes études. Je n'oublie pas aussi Fanny et Alexis, Nathalie, Ilizabete et JeF, Boris et Eléa.

A mes clubs de plongée, qui m'ont permis un autre type d'immersion : merci aux membres de l'UCB1 plongée et du club Safari.

J'ai aussi une pensée pour les milliers de palourdes asiatiques, les quelques huîtres et autres moules, qui ont participées, de façon bien involontaire, à la réalisation de cette thèse.

TABLES DES MATIERES

Listes des communications	8
Listes des abréviations	10
Tables des illustrations	12
I INTRODUCTION	16
I.A LES BIOMARQUEURS	17
I.A.1 Notion de biomarqueurs	17
I.A.2 Intérêts des biomarqueurs	18
I.A.3 Les approches multimarqueurs	21
I.B CONTEXTE DE L'ETUDE	23
I.C OBJECTIFS	25
I.D LES POLLUANTS DANS L'ENVIRONNEMENT	27
I.D.1 Contamination par les hydrocarbures	28
I.D.2 Les pesticides	28
I.D.3 Les métaux	28
I.E L'ESPECE SENTINELLE : <i>CORBICULA FLUMINEA</i>	31
I.E.1 Systématique	31
I.E.2 Ecologie	32
I.E.3 Anatomie, physiologie	32
I.E.3.1 Le manteau	34
I.E.3.2 Les branchies	34
I.E.3.3 La masse viscérale	34
I.E.3.4 Les muscles adducteurs et le pied	35
I.E.4 Utilisation en tant qu'espèce sentinelle	35
I.F CHOIX DES BIOMARQUEURS	37
II SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	39
II.A GENOTOXICITE	39
II.A.1 La toxicité de l'oxygène	39
II.A.2 Les espèces réactives de l'oxygène	41
II.A.3 Les défenses contre les dommages à l'ADN	42
II.A.4 Les dommages à l'ADN	43
II.A.5 Conséquences biologiques des dommages à l'ADN	46
II.B IMMUNOTOXICITE	48
II.B.1 Le système immunitaire	48
II.B.1.1 Les types cellulaires	49
II.B.2 Rôles des hémocytes	49
II.B.2.1 Cicatrisation	49
II.B.2.2 Réparation de la coquille	50
II.B.2.3 Transport et digestion des nutriments	50
II.B.2.4 Défense interne	51
II.B.2.4.a Fraction cellulaire	51
II.B.2.4.b Fraction humorale	52
II.B.2.4.c Destruction enzymatique	53
II.B.2.5 Produits immunotoxiques et leurs effets	54
II.B.2.5.a Les métaux	55
II.B.2.5.b Les composés organiques	55
II.B.2.5.c Les dérivés de synthèse	55
II.C REPROTOXICITE	59

II.C.1 Le système endocrinien chez les bivalves	59
II.C.1.1 Les neurotransmetteurs	59
II.C.1.2 Les hormones stéroïdiennes	59
II.C.1.3 La vitellogenèse chez les bivalves	61
II.C.2 Les perturbateurs endocriniens	62
II.D MARQUEURS GENERAUX DE STRESS	65
II.D.1 Les lysosomes	65
II.D.1.1 Classification	65
II.D.1.2 Les lysosomes primaires	67
II.D.1.3 Les lysosomes secondaires	67
II.D.1.3.a Les hétérolysosomes	67
II.D.1.3.b Les autolysosomes	69
II.D.1.4 La sécrétion régulée des lysosomes	69
II.D.2 Conséquences d'une exposition aux xénobiotiques	69
II.D.3 Utilisation des lysosomes comme biomarqueur	70
III MATERIELS ET METHODES	72
III.A CHOIX DES TECHNIQUES	72
III.A.1 Génotoxicité	72
III.A.1.1 Dosage de la 8-oxodG	72
III.A.1.2 Test du désassemblage de l'ADN (<i>DNA unwinding</i>)	76
III.A.2 Immunotoxicité	78
III.A.2.1 Technique avec les microbilles de latex	79
III.A.2.2 Technique avec les levures	81
III.A.3 Viabilité cellulaire	82
III.A.4 Reprotoxicité	83
III.A.4.1 Détermination des phosphoprotéines - VTG-like : dosage des phosphates labiles en milieu alcalin	83
III.A.4.2 Histologie des gonades	85
III.A.5 Effets généraux	86
III.A.5.1 Réponses lysosomiales	86
III.A.5.1.a Changements structuraux des lysosomes	86
III.A.5.1.b Stabilité lysosomiale	90
III.A.5.2 Les indices de condition	92
III.B CONDITIONS EXPERIMENTALES	94
III.B.1 Développement en conditions contrôlées	94
III.B.1.1 Expérimentation n°1 préliminaire – exposition <i>in vitro</i> d'hémocytes de <i>C. fluminea</i> au cadmium	94
III.B.1.2 Expérimentation n°2 – exposition de <i>C. fluminea</i> au cadmium	94
III.B.1.3 Expérimentation n°3 – exposition de <i>C. fluminea</i> au tributyl-étain et au 17 β -œstradiol	95
III.B.2 Application et validation en conditions semi-contrôlées (<i>mésocosmes</i>)	96
III.B.2.1 Acclimatation des animaux	96
III.B.2.2 Système d'exposition	96
III.B.2.3 Contrôle des paramètres physico-chimiques et des contaminations	98
III.B.2.4 Exposition	98
III.B.2.5 Expérimentation n°4 – exposition au méthacrylate de méthyle	99
III.B.2.5.a Contaminations	99
III.B.2.5.b Mesures des biomarqueurs	99
III.B.2.6 Expérimentation n°5 – exposition à des produits purs et en mélanges	100
III.B.2.6.a Contaminations	100

III.B.2.6.b Mesures des biomarqueurs.....	102
III.B.3 Statistiques.....	102
IV RESULTATS - DISCUSSION.....	104
IV.A DEVELOPPEMENT EN CONDITIONS CONTROLEES	104
IV.A.1 <i>Expérimentation préliminaire : exposition in vitro</i>	105
Article 1: <i>In vitro</i> exposure to cadmium of haemocytes from the Asian clam <i>Corbicula fluminea</i> (M.)	
IV.A.2 <i>Expositions en aquariums</i>	121
IV.A.2.1 Exposition au cadmium.....	121
Article 2 : Immuno- and cytotoxicological responses of the Asian clam <i>Corbicula fluminea</i> (M.) experimentally exposed to cadmium	122
IV.A.2.1.a Autres marqueurs employés	141
IV.A.2.1.b Comparaison des réponses de la phagocytose : mesures en cytométrie de flux et avec lecteur de microplaques.....	143
IV.A.2.1.c Conclusion de l'exposition en aquarium au cadmium.....	144
IV.A.2.2 Expositions au tributyl-étain et au 17 β -œstradiol.....	145
Article 3 : Effects of tributyltin and 17 β -estradiol on immune and lysosomal systems of the Asian clam <i>Corbicula fluminea</i> (M.)	146
IV.A.2.2.a Autres marqueurs employés	165
IV.A.2.2.b Conclusion de l'exposition au TBT et 17 β -œstradiol	166
IV.A.2.3 Conclusion	166
IV.B APPLICATION ET VALIDATION EN CONDITIONS SEMI-CONTROLEES.....	167
IV.B.1 <i>Exposition au méthacrylate de méthyle</i>	168
IV.B.1.1 Objectifs	168
IV.B.1.2 Conditions physico-chimiques	168
IV.B.1.2.a Paramètres environnementaux.....	168
IV.B.1.2.b Concentration du MAM dans les canaux	172
IV.B.1.3 Mesures des biomarqueurs.....	173
IV.B.1.3.a Mortalité.....	173
IV.B.1.3.b Indices de condition.....	173
IV.B.1.3.c Viabilité cellulaire.....	174
IV.B.1.3.d Activité de phagocytose des hémocytes	175
IV.B.1.3.e Réponse des lysosomes – changements structuraux des lysosomes.....	176
IV.B.1.3.f 8-oxodG.....	177
IV.B.1.4 Discussion	178
IV.B.1.5 Conclusion	179
IV.B.2 <i>Evaluation de la réponse des biomarqueurs d'effets avec des substances pures ou des mélanges</i>	180
IV.B.2.1 Les mélanges.....	180
IV.B.2.1.a Mélanges simples et complexes.....	180
IV.B.2.1.b Terminologie	180
IV.B.2.2 Objectifs	181
IV.B.2.3 Conditions physico-chimiques	181
IV.B.2.4 Concentrations des produits dans les canaux	185
IV.B.2.5 Mesures des biomarqueurs.....	187

IV.B.2.5.a Mortalité.....	187
IV.B.2.5.b Indices de condition.....	188
IV.B.2.5.c Activité de phagocytose des hémocytes	188
IV.B.2.5.d Réponse des lysosomes	189
IV.B.2.5.e 8-oxodG	193
IV.B.2.6 Discussion	193
IV.B.2.6.a Comparaison mortalité/biomarqueurs.....	197
IV.B.2.6.b Comparaisons de l'échelle indiciaire multimarqueurs à l'abondance des oligochètes et aux biomarqueurs d'effets	198
IV.B.2.7 Conclusion	200
<i>IV.B.3 Conclusion sur les expositions en mésocosmes</i>	<i>200</i>
V CONCLUSION GENERALE	203
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	207
ANNEXE : Publications	228

COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

Champeau, O., Mazères, G., Narbonne, J.-F.. *In vitro* exposure to cadmium of haemocytes from the Asian clam *Corbicula fluminea* (M.). *Toxicology in Vitro* (soumise)

Champeau, O., Auffret, M., Cajaraville, M.P., Bassères, A., Narbonne, J.-F., Immuno- and cytotoxicological responses on the Asian clam *Corbicula fluminea* (M.) experimentally exposed to cadmium. *Biomarkers* (acceptée)

Champeau, O., Narbonne J.-F., Exposure to TBT and 17 β - estradiol of the Asian clam *Corbicula fluminea*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* (soumise)

Narbonne J.F., Aarab N., Clérandeau C., Daubèze M., Narbonne J., Champeau O., Garrigues P. (2005) Scale of classification based on biochemical markers in mussel: application to pollution monitoring in Mediterranean coasts and temporal trends. *Biomarkers*, 10 (1), 58-71

Aarab N., Champeau O., Mora P., Daubeze M., Garrigues P. & Narbonne J-F. (2004) Scoring approach based on fish biomarkers applied to French river monitoring. *Biomarkers*, 9 (3), 258-270

Liess M., Champeau O., Riddle M., Schulz R., Duquesne S. (2001) Combined effects of ultraviolet-B radiation and food shortage on the sensitivity of the Antarctic amphipod *Paramoera walkeri* to copper. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20 (9):2088-2092

COMMUNICATIONS ORALES

Champeau, O., Auffret, M., Cajaraville, M.P., Bassères, A., J.-f. Narbonne
Immuno- and cytotoxicological responses on the Asian clam *Corbicula fluminea* (M.) experimentally exposed to cadmium.
SETAC - Europe, Lille, France, 22-26 mai 2005

Champeau O., Bassères A., Narbonne J.-F.
Biomarqueurs d'effets : utilisation en mésocosmes
Séminaire : Validation des biomarqueurs d'exposition dans les Rivières Pilote (TOTAL)
Lacq/Mont, France, 12-13 décembre 2004

Aarab N., Mora P., Champeau O., Narbonne J.F.
In vitro metabolism of testosterone in marine organisms : Improvement of testosterone metabolites detection in mussel and fish.
BEEP meeting congress, Athènes, Grèce, 4-6 décembre 2002

Duquesne S., Schulz R., Champeau O., Riddle M. & Liess M.
Marine invertebrates and heavy metal contamination in Antarctic coastal waters, comparison with non polar species.
SETAC - Europe, Leipzig, Allemagne, 25-29 Mai 1999

PRESENTATIONS AFFICHEES

Champeau O., Auffret M., Lagroye I., Bassères A., Narbonne J.F., Use of mesocosms to assess biomarkers effects of contaminants mixture and alone.
SETAC – Europe, Prague, République Tchèque, 17-22 avril 2004

9th FECS Conference/2nd SFC meeting, Bordeaux, France, 29 août-1 septembre 2004

Champeau O., Auffret M., Lagroye I., Bassères A., Narbonne J.F. and Garrigues P., Immune response of *Corbicula fluminea* exposed to a mixture of contaminants in artificial streams.
ISPAC 2003 conference, Amsterdam, Pays Bas, 21-25 septembre 2003

Liess M., Duquesne S., Champeau O., Riddle M. and Schulz R., Contaminants in the Antarctic Environment. The combined effects of contamination and UV-B irradiation.
ISCORD 2000 conference, Hobart, Tasmanie, 30 janvier-5 février 2000

ABREVIATIONS

8-oxodG	8-oxo-7,8-dihydro-2' désoxyguanosine
AMCA	Acide monochloracétique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
CE	Concentration efficace
CL	Concentration létale
DBO5	Demande biologique en oxygène en 5 jours
DCE	Directive Cadre Eau
DCO	Demande chimique en oxygène
DDE	Dichloro-diphényl dichloroéthylène
DDT	Dichloro-diphényl trichloroéthane
dG	Désoxyguanosine
DL50	Dose létale provoquant la mort de 50% des organismes exposés à un toxique
E2	17 β -œstradiol
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétate
ELISA	<i>Enzyme linked Immunosorbant Assay</i>
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
FapydG (FapyGua)	2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine
FSC	<i>Forward scattered</i>
GMH	Hormone de mobilisation du glycogène
GMSF	Facteur stimulateur de la mitose dans la gonade
GRd	Glutathion réductase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
GST	Glutathion <i>S</i> -transférase
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
HA	Huile anthracénique
HAP ou PAH	Hydrocarbure aromatique polycyclique (ou <i>polycyclic aromatic hydrocarbon</i>)
HPLC-EC	Chromatographie liquide haute pression couplée à une détection électrochimique
HSD	Hydroxystéroïde déshydrogénase
HSPs	Protéines de choc thermique (<i>heat shock proteins</i>)
HT	Testostérone hydrolase
I	Etude <i>in vitro</i>
IC	Indice de condition
IL	Substance de type insuline (<i>Insulin like</i>)
kb	Kilo bases
L	Etude en laboratoire
LOEC	Plus petite concentration d'exposition provoquant des effets délétères significatifs sur les organismes (<i>Lowest observed effect concentration</i>)
LP	Temps de déstabilisation de la membrane lysosomiale
M	Etude en milieu naturel
MAM	Méthacrylate de méthyle
MB	Méthylbladan [®] (méthyl parathion)
MCPA	Acide 4-chloro-2-méthylphénoxy acétique
MDA	Malonedialdéhyde
Me ²⁺	Ion métallique

MPI	Echelle indiciaire multimarqueurs (<i>multiparametric index</i>)
MTs	Métallothionéines
NADPHred	NADH-cytochrome <i>c</i> (P450) réductase
NOEC	Plus grande concentration ne provoquant aucun effet significatif sur les organismes (<i>Non observed effect concentration</i>)
Nv	Densité numérique lysosomiale
PCB	Polychlorobiphényle
PChE	Propionylcholine estérase
Pt	Phosphore total
S/V	Rapport des densités surfacique et volumique
Se GPx	Glutathion peroxydase sélénium dépendante
SEQ	Système d'évaluation de la qualité
SOD	Superoxyde dismutase
SSC	<i>Side scattered</i>
Sv	Densité surfacique lysosomiale
TBT	Tributyl-étain
VTG	Vitellogénine
Vv	Densité volumique lysosomiale

TABLES DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Représentation des méthodologies permettant d'évaluer les risques écotoxicologiques modifié d'après Lagadic & Amiard (1997)	18
Figure 2 : Progression de l'état de santé d'un individu à l'exposition d'une augmentation de la concentration d'un polluant (Allen & Moore, 2004).....	20
Figure 3 : Gradient de pollution déterminé à l'aide de l'échelle indiciaire multimarqueurs sur une rivière autour d'un rejet (Vidal, 2001).	22
Figure 4 : Sources de pollution dans l'environnement	27
Figure 5 : <i>Corbicula fluminea</i> (M.)	31
Figure 6 : <i>C. fluminea</i> dans sa position naturelle à l'interface sédiment-eau (Britton & Morton, 1982).	32
Figure 7 : Anatomie des principaux organes de <i>C. fluminea</i>	33
Figure 8 : Coupe sagittale de <i>C. fluminea</i> mettant en évidence les principaux organes.....	33
Figure 9 : A. Coupe longitudinale de <i>C. fluminea</i> mettant en évidence l'appareil digestif. B. Détail du chemin des aliments dans l'estomac.....	35
Figure 10 : Origine des espèces réactives de l'oxygène et action des enzymes antioxydantes (Lagadic, <i>et al.</i> , 1997 ; Kelly, <i>et al.</i> , 1998)	40
Figure 11 : Représentation schématique des sites sensibles à l'oxydation sur l'ADN (Halliwell & Aruoma, 1991)	43
Figure 12 : Principaux dommages à l'ADN	44
Figure 13 : Schéma d'oxydation de la guanosine avec l'oxygène singulet, un électron et le radical $\cdot\text{OH}$ (Cadet, <i>et al.</i> , 2003).	45
Figure 14 : Dommages cellulaires causés par les espèces réactives de l'oxygène (Kehrer, 1993)	47
Figure 15 : Conséquences biologiques des dommages à l'ADN (Frelon, 2001).....	47
Figure 16 : Schéma du système artériel de <i>Crassostrea virginica</i> (Cheng, 1981).	48
Figure 17 : Diagramme montrant une lignée hypothétique des hémocytes chez les bivalves (Cheng, 1981).	49
Figure 18 : Production de radicaux au cours de la lutte contre une infection (Deby, 1991)	53
Figure 19 : Toxicité induite par des xénobiotiques dans les hémocytes.....	54
Figure 20 : Synthèse des représentations des composantes enzymatiques et hormonales de la stéroïdogénèse rencontrées chez les bivalves (Gauthier-Clerc, 2003).	60
Figure 21 : Schématisation de l'action d'hormones des bivalves au cours de la reproduction (Gauthier-Clerc, 2003).....	61
Figure 22 : Lysosomes, hétérolysosomes et vacuoles autophagiques (Maillet, 1992)	66
Figure 23 : Protocole d'extraction d'ADN	73
Figure 24 : Protocole de séparation de l'ADN simple/double brin	76
Figure 25 : Schéma de représentation du cytomètre en flux	80
Figure 26 : Distribution des cellules en fonction de leur taille (FSH) et de leur complexité (granulation) (SSC).....	80
Figure 27 : Analyse cytométrique de l'activité de la phagocytose par les hémocytes des sphères fluorescentes.	81
Figure 28 : Protocole d'extraction des phosphates labiles en milieu alcalin	84
Figure 29 : Epaisseur de coupes dans une matrice avec des particules incluses	89
Figure 30 : Schéma des rivières artificielles (Rivières Pilotes, Lacq (64), TOTAL)	97
Figure 31 : Coupes de masses viscérales de <i>C. fluminea</i> pour la mesure de la stabilité lysosomiale.	141
Figure 32 : Taux de 8-oxodG pour 10^5 dG, mesurés dans les branchies de <i>C. fluminea</i> exposées au cadmium.	142
Figure 33 : Mesures en microplaque	143
Figure 34 : Mesures en cytométrie en flux.....	143
Figure 35 : Interactions bidirectionnelles entre le système endocrinien et le système immunitaire (Ahmed, 2000).....	145
Figure 36 : Tributyl-étain et 17β -œstradiol	145
Figure 37 : Coupe dans la masse viscérale de <i>C. fluminea</i> après 30 jours d'exposition	165
Figure 38 : Evolution de la température de l'eau au cours du temps.....	170
Figure 39 : Evolution de l'oxygène dissous dans l'eau au cours du temps	170
Figure 40 : Evolution du pH de l'eau au cours du temps	171
Figure 41 : Evolution de la conductivité de l'eau au cours du temps.....	171

Figure 42 : Concentrations (mg/L) de MAM dans les canaux en fonction du temps (jours).....	172
Figure 43 : Taux de mortalité de <i>C. fluminea</i> mesuré au début de l'exposition, avant l'injection des produits (0) puis après 7, 15 et 30 jours.....	173
Figure 44 : Indices de condition mesurés au début de l'exposition avant l'injection des produits (T0), puis après 7, 15 et 30 jours d'exposition.	174
Figure 45 : Viabilité cellulaire (en pourcentage par rapport aux témoins).....	175
Figure 46 : Inhibition de la phagocytose	175
Figure 47 : Moyennes et écart-types des paramètres stéréologiques mesurés sur les lysosomes de la glande digestive de <i>C. fluminea</i> exposées au MAM pour 7, 15 et 30 jours.	176
Figure 48 : Taux de 8-oxodG (nombre de bases oxydées pour 10 ⁶ bases normales) mesurés dans les branchies de <i>C. fluminea</i> exposées au MAM pendant 7, 15 et 30 jours.	177
Figure 49 : Evolution de l'oxygène dissous dans l'eau au cours de l'expérimentation.....	182
Figure 50 : Evolution de la conductivité de l'eau au cours de l'expérimentation	182
Figure 51 : Evolution du pH de l'eau au cours de l'expérimentation.....	183
Figure 52 : Evolution de la température de l'eau au cours de l'expérimentation.....	183
Figure 53 : Débit (mesuré au courantomètre en sortie de pépinière)	184
Figure 54 : Valeurs des concentrations (en µg/L) des produits seuls (canaux 9, 8, 5, 12).....	185
Figure 55: Valeurs des concentrations (en µg/L) pour chaque produit, dans les mélanges binaires (canaux 2, 4, 6, 7, 11, 14).....	185
Figure 56 : Valeurs des concentrations (en µg/L) de chaque produit, dans les mélanges ternaires (canaux 1, 3, 13, 15).....	186
Figure 57 : Taux de mortalité des palourdes d'eau douce par condition.....	187
Figure 58 : Indices de condition représentés par le taux de remplissage de la cavité palléale pour chaque condition d'exposition à 7, 15 et 30 jours et lors du prélèvement sur le site du lac de Cazaux-Sanguinet.	188
Figure 59 : Activité de phagocytose des hémocytes de <i>Corbicula fluminea</i>	189
Figure 60 : Résultats de la mesure des paramètres stéréologiques des lysosomes de la glande digestive des palourdes d'eau douce pour les différentes conditions d'exposition après 7, 15 et 30 jours et après 7 jours de dépuration.....	192
Figure 61 : Taux de 8-oxodG pour 10 ⁶ bases normales dans les branchies de <i>C. fluminea</i>	193
Figure 62 : Indices de condition (représentés par le taux de remplissage de la cavité palléale) chez des <i>C. fluminea</i>	194
Figure 63 : Abondance des oligochètes (données TOTAL)	199
Figure 64 : Chronologie possible des réponses des biomarqueurs d'exposition et d'effets lors d'un stress subit.....	205

Tableau 1 : Systématique de <i>Corbicula fluminea</i> (Müller) replacée dans la classification phylogénétique du vivant (Lecointre & Le Guyader, 2001)	31
Tableau 2 : Répartition des différents biomarqueurs d'effets	37
Tableau 3 : Modulation de l'activité des cellules phagocytaires	58
Tableau 4 : Composés impliqués dans les mécanismes de perturbation endocrinienne chez les invertébrés (Depledge & Billinghamurst, 1999).	62
Tableau 5 : Principale composition enzymatique des lysosomes (Allison, 1974).....	68
Tableau 6 : Variations des paramètres stéréologiques lysosomiaux chez diverses espèces de bivalves avec l'augmentation de la concentration du polluant considéré.....	87
Tableau 7 : Concentrations du MAM dans les canaux	99
Tableau 8 : Concentrations appliquées lors des expérimentations sur les interactions	100
Tableau 9 : Plan des mélanges : organisation des contaminants dans les canaux	100
Tableau 10 : Taux de 8-oxodG dans les branchies de deux bivalves sur des sites de référence, mesurés par chromatographie liquide haute pression couplée à un détecteur électrochimique.	143
Tableau 11 : Concentrations nominales et moyennes (avec écart-type) du méthacrylate de méthyle dans l'eau	172
Tableau 12 : A. Echelle indiciaire multimarqueurs et B. réponses significatives des biomarqueurs d'effets, en fonction des concentrations de MAM (mg/L) et du temps d'exposition	179
Tableau 14 : Exemple de termes utilisés pour la description de différents types actions communes (modifié d'après Marking (1985)).	181
Tableau 15 : Variations des paramètres stéréologiques au cours du temps.....	189
Tableau 16 : Comparaison mortalité/réponses des biomarqueurs d'effets	197
Tableau 17 : Echelle indiciaire multimarqueurs (données TOTAL)	198
Tableau 18 : Echelle indiciaire multimarqueurs avec report des faux négatifs	199
Tableau 19 : Récapitulatif des paramètres retenus comme biomarqueurs d'effets chez <i>C. fluminea</i>	203

Introduction générale

I Introduction

L'introduction de produits chimiques dans le milieu naturel constitue une préoccupation majeure dans la surveillance de l'environnement. En effet, celui-ci subit en permanence des séries de contraintes liées aux activités humaines.

Actuellement, les gestionnaires de l'environnement envisagent un contrôle strict des ressources naturelles telles que l'eau, permettant de respecter l'ensemble des communautés vivant dans les écosystèmes. Pour atteindre un tel objectif, il est important de disposer d'outils pertinents qui permettent de rendre compte de la qualité des écosystèmes et de la santé des communautés rattachées à ces écosystèmes. L'analyse chimique, qui mesure les concentrations en produits toxiques dans les milieux, permet de répondre partiellement à ces besoins.

Si cette approche reste indispensable pour identifier les causes, elle se restreint toutefois aux composés dont la présence est suspectée et pour lesquels une méthode de dosage, dans des matrices souvent complexes, est disponible. Aussi, la grande diversité des polluants potentiellement présents dans le milieu est à surveiller. Enfin, si les analyses chimiques renseignent sur la présence ou non d'un polluant dans les différents compartiments de l'écosystème (eau, sol, sédiments, organismes), cela reste insuffisant pour prédire l'impact des mélanges de substances toxiques sur les organismes. Les nombreuses interactions entre polluants et entre polluants/organismes, qui existent dans le cas de pollutions multiples, ainsi que la biodisponibilité de ces polluants dans l'environnement ne sont pas prises en compte dans l'approche purement analytique.

De plus, les analyses, lorsqu'elles sont possibles, posent rapidement un problème de coût et de personnel compétent. Si on considère que beaucoup de contaminants, comme les polluants organiques, peuvent causer des effets biologiques significatifs, avec des concentrations très faibles dans le milieu, la recherche peut se tourner vers le suivi de ces effets basés sur la biologie plutôt que le suivi chimique des contaminants eux-mêmes (Lam & Gray, 2003).

La recherche environnementale, initiée dans les années 60, a révélé que beaucoup d'organismes peuvent accumuler certains toxiques entraînant des concentrations corporelles beaucoup plus élevées que celle présente dans leur environnement (Portmann, 1975). On a donc émis l'idée que les concentrations mesurées dans ces organismes pourraient être utilisées dans les procédures de surveillance en routine. Plusieurs programmes de surveillance dans le monde utilisent des « espèces sentinelles » telles que les moules et les huîtres (programme américain – the *Mussel Watch Project* (Bayne, B. L., 1989), et dans le même esprit, le Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin (RNO) créé en France par l'IFREMER et le Ministère de l'Environnement) en tant qu'indicateurs de contaminants dans les environnements marins et estuariens. Les concentrations corporelles en contaminants peuvent être ultérieurement utilisées pour en évaluer leur absorption par les organismes vivants et l'augmentation de la concentration d'un polluant depuis l'environnement vers l'organisme (bioaccumulation) où certains tissus vont avoir un rôle prépondérant, en séquestrant de façon préférentielle le polluant. Ces contaminants peuvent être transférés dans la chaîne alimentaire. Ils vont montrer un accroissement de leur concentration au fur et à mesure qu'ils circulent vers les niveaux supérieurs du réseau trophique dans lequel l'Homme est le consommateur final. Cette bioamplification peut alors augmenter les possibilités d'impacts.

Les analyses biologiques qui intègrent les interactions entre tous les polluants présents et les organismes, permettent de fournir un diagnostic plus réaliste de l'impact de la pollution sur les organismes et les écosystèmes. L'impact d'un stress d'origine anthropique sur les écosystèmes, comme la pollution chimique, peut être mesuré à différents niveaux qui se distinguent en terme de sensibilité et de pertinence écologique.

Dans ce contexte, les organismes ou les communautés qui réagissent à un effet environnemental, par des variations mesurables au niveau des effectifs des populations (abondance et diversité d'espèces), permettent de mettre en évidence un changement significatif dans l'environnement et peuvent être considérés comme des « bio-indicateurs ». En général, ces espèces peuvent être divisées en 3 catégories :

Les **indicateurs biologiques** qui renseignent sur la composition et la structure des écosystèmes en observant la simple présence ou absence d'espèces.

Les **organismes tests**, utilisés dans des procédures standardisées dans les laboratoires de recherche en écotoxicologie.

Les **organismes de surveillance** qui permettent de mesurer la qualité et la quantité de substances nuisibles dans l'environnement et dans quelques cas d'en détecter les effets. Ces organismes indicateurs peuvent déjà exister dans l'écosystème (surveillance passive) ou y être introduits de façon standardisée (surveillance active).

D'autres types de surveillances peuvent aussi être développés. Elles sont basées sur les changements des caractéristiques biochimiques, physiologiques ou comportementales des organismes. Elles peuvent également porter sur les attributs des communautés écologiques traditionnelles telles que l'abondance et la diversité.

Depuis une trentaine d'années, les progrès de la biologie cellulaire ont permis une identification des mécanismes moléculaires de l'action toxique. Ces connaissances fondamentales ont ouvert la possibilité de forger de nouveaux outils d'évaluations et de surveillance basés sur les cascades d'événements moléculaires induits par l'exposition d'organismes vivants à des xénobiotiques. En fonction du niveau d'observation choisi dans cette cascade d'événements, on se situera en début de processus (proche de la première interaction entre le xénobiotique et une macromolécule cellulaire) ou au niveau de l'expression clinique de l'altération pathologique. Ceci a donné naissance au concept de « biomarqueurs », en référence à des mesures de modifications de paramètres biochimiques impliqués dans les mécanismes moléculaires de toxicité. Ce concept initial de biomarqueurs a été affiné au cours de deux décennies de recherches d'effets biochimiques multiples spécifiques débouchant sur la notion de multimarqueurs ou plus récemment de signature biologique. Les outils dérivés de ces concepts concernent les « biomarqueurs d'exposition » (proches d'événements moléculaires précoces, traduisant l'exposition des organismes à des composés toxiques) et les « biomarqueurs d'effets », indicateurs d'atteintes de fonctions physiologiques des individus exposés.

I.A Les biomarqueurs

I.A.1 Notion de biomarqueurs

A partir des années soixante-dix, le formidable développement de la toxicologie moléculaire utilisant les outils de la biochimie et de la biologie moléculaire, a permis de progresser dans la connaissance des mécanismes de toxicité, principalement chez des mammifères modèles comme le rat. Par la suite, pour plusieurs polluants, des effets biochimiques relativement sensibles et spécifiques ont pu être mis en évidence chez des espèces ayant un intérêt écotoxicologique tels que les oiseaux, les poissons ou les mollusques. On peut citer, par exemple :

- l'induction de la synthèse de métallothionéines par une exposition à des sels de métaux comme le cuivre ou le cadmium (Roch, *et al.*, 1982),
- l'induction de monooxygénases liées au cytochrome P450 par certains contaminants liposolubles comme les HAP (Payne, 1976) et les PCB (Narbonne & Gallis, 1979),
- l'inhibition de l'activité acétylcholinestérase par les pesticides carbamates et organophosphorés (Coppage & Braidrech, 1976).

Parmi ces indices biochimiques, l'induction des métallothionéines par certains métaux et des activités monooxygénases liées au P450 par certains composés liposolubles représentent une réponse adaptative à la présence de polluants. Les mécanismes de détoxification sont souvent mis en jeu avant la manifestation des effets toxiques et peuvent donc servir d'indicateurs précoces, sensibles et, dans une certaine mesure, spécifiques. Parallèlement, des techniques permettant de mesurer les effets sur certains processus comme la génotoxicité (Randerath, *et al.*, 1981) ou l'immunotoxicité (Vos, 1980) ont été développées.

La mesure des perturbations métaboliques consécutives à une contamination est donc représentative de l'exposition des organismes cibles et est, théoriquement, corrélée aux teneurs en contaminants (même pour des concentrations à l'état de traces) dans l'écosystème.

C'est dans les années quatre-vingts que la notion de biomarqueurs prend forme. Cette période voit se dérouler les premiers symposiums internationaux sur les réponses aux polluants des animaux marins (*Pollutant Responses in Marine Animals*, 1981) et les tests écotoxicologiques dans l'environnement marin (1983), ainsi que divers programmes (Groupement Interface Chimie-Biologie des Ecosystèmes Marins, 1987) (Narbonne, 2000). Après cette phase de développement, les biomarqueurs ont trouvé leur définition (workshop sur les biomarqueurs organisé par la Société de Toxicologie et de Chimie de l'Environnement (SETAC), 1989) : ce sont des *variations biochimiques, physiologiques, histologiques ou morphologiques, mesurées chez des organismes exposés à des conditions de stress liées à la présence de substances chimiques dans l'environnement* (Huggett, *et al.*, 1992). Ils représentent la réponse biologique initiale des organismes face à des perturbations ou des contaminations du milieu dans lequel ils vivent. En conséquence, ils sont en général plus sensibles que les paramètres mesurés à un niveau supérieur d'organisation biologique tel que l'organe, l'individu ou la population (Stegeman, *et al.*, 1992) (Figure 1).

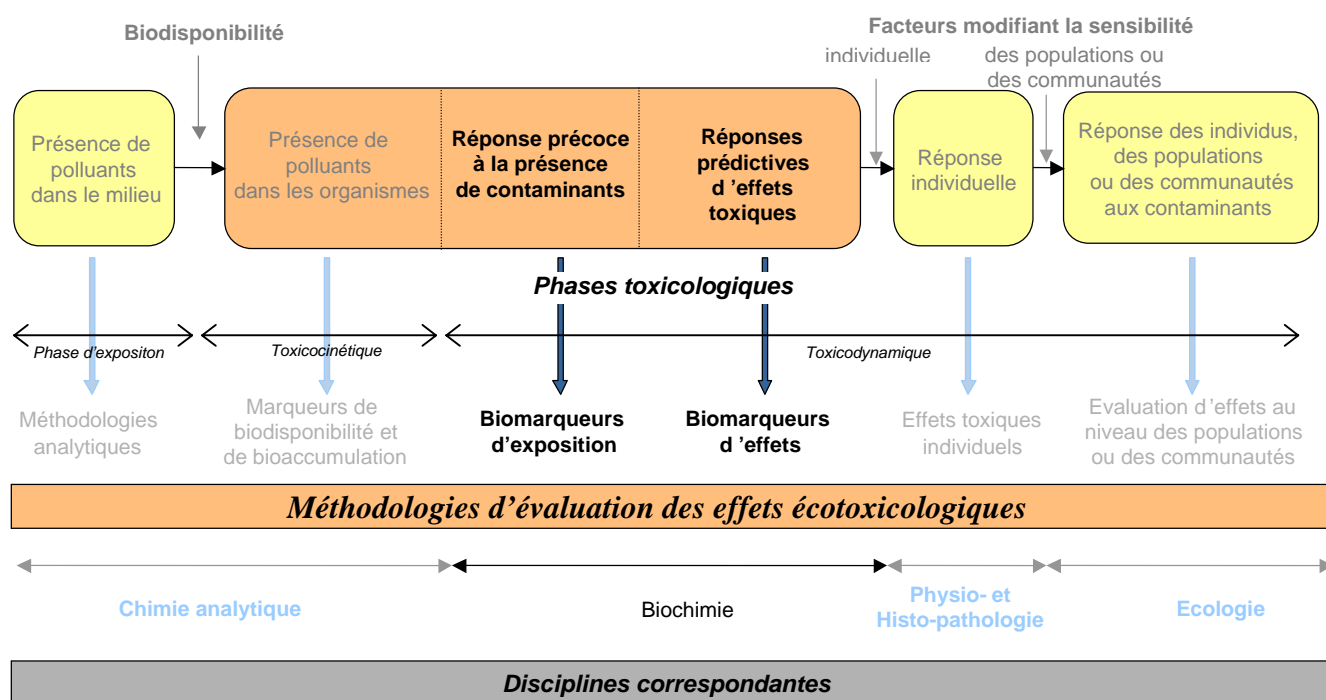


Figure 1 : Représentation des méthodologies permettant d'évaluer les risques écotoxicologiques modifié d'après Lagadic & Amiard (1997)

I.A.2 Intérêts des biomarqueurs

L'approche « biomarqueur » peut être illustrée par une relation entre l'état de santé d'un organisme et sa réponse à des concentrations croissantes de contaminants dans son environnement. Ainsi, dans un environnement vierge de toute influence, en supposant que toutes les ressources nécessaires à la vie soient disponibles et sans stress de contamination, un organisme est considéré en « bonne santé », dans un état d'homéostasie. Si la concentration en contaminant augmente, l'organisme subit un état de stress grandissant, jusqu'à un état où apparaissent des altérations fonctionnelles visibles pouvant entraîner la mort à plus ou moins long terme. Durant les phases de

ces processus, l'organisme peut être capable de compenser le stress subi, mais arrivé à un certain point, il lui devient impossible d'effectuer cette compensation. Cependant, si le contaminant est retiré de l'environnement, il peut retrouver son état normal (l'altération est réversible). Lorsque la quantité de polluant devient trop importante, l'organisme atteint un stade où son altération devient irréversible et la compensation n'est plus possible, entraînant inéluctablement sa mort.

Les premiers événements mesurables lors d'un contact organisme/contaminant ont lieu au niveau moléculaire. La toxicité d'un produit chimique est inhérente à ses propriétés physico-chimiques et dépend de plusieurs processus en compétition : son absorption, sa distribution, sa transformation et son excrétion. Les effets toxiques se manifestent par l'interaction du xénobiotique avec des molécules endogènes, puis par une atteinte à l'intégrité de la cellule, du tissu, de l'organisme et enfin de la population et de l'écosystème. Différents biomarqueurs peuvent être utilisés tout au long de ce continuum (Figure 2) pour évaluer l'état de santé des organismes. Le développement de leur utilisation comme outil de surveillance et d'évaluation de l'environnement est étroitement lié à la connaissance des mécanismes moléculaires des processus toxiques chez différentes espèces, animales ou végétales, appartenant aux différents écosystèmes.

Des biomarqueurs biochimiques et cellulaires ont été étudiés chez les organismes marins, et particulièrement chez les poissons (Narbonne & Gallis, 1979; Lemaire, *et al.*, 1992; McFarland, *et al.*, 1999; Köhler, *et al.*, 2002) et les mollusques bivalves (Cajaraville, *et al.*, 1995b; Labrot, *et al.*, 1996; Cossu, *et al.*, 1997; Regoli, *et al.*, 1997; Basack, *et al.*, 1998).

Un des avantages de l'approche biologique est sa capacité de prévention : l'étude de marqueurs biologiques de pollution permet de détecter de manière précoce, au niveau cellulaire, l'impact des polluants sur les organismes, afin de prévenir une éventuelle détérioration des écosystèmes (Narbonne & Michel, 1993). Cependant, c'est un outil qui doit être manipulé avec précaution car il nécessite une parfaite connaissance des facteurs biotiques et abiotiques du milieu ainsi que les fluctuations naturelles du biomarqueur lui-même. Ces connaissances permettent de se préserver d'une confusion possible entre les variations naturelles et les perturbations causées par les xénobiotiques.

Les travaux réalisés en laboratoire ont permis de classer les biomarqueurs suivant la spécificité de leur réponse à certaines molécules (Narbonne, *et al.*, 1999c).

Classiquement, les auteurs distinguent les biomarqueurs d'exposition, d'effets et de sensibilité/susceptibilité (Lagadic, *et al.*, 1997; Kammenga, *et al.*, 2000) selon les événements toxicologiques :

Les **biomarqueurs d'exposition** sont généralement caractérisés par leur réponse précoce et leur spécificité de réaction. Ils sont induits par un type spécifique de polluants et, de ce fait, leurs variations sont indicatrices d'une exposition de l'organisme à cette classe de polluants. Un biomarqueur d'exposition peut être considéré comme une réponse biologique à des interactions entre un type de polluant et une cellule ou une molécule cible à l'intérieur de l'organisme, sans que cette réponse n'ait pour autant de répercussions néfastes sur l'état de santé de l'individu. Il témoigne de la présence d'un contaminant dans le milieu et de sa disponibilité (biodisponibilité) pour l'organisme. Ce sont par exemple, les mesures des teneurs en contaminants eux-mêmes ou en métabolites qui en sont dérivés. Cette notion de marqueur d'exposition s'est également étendue à la mesure des réactions cellulaires de certains effets biologiques précoces ne présentant pas de toxicité immédiate pour les organismes, comme par exemple l'induction de certaines activités enzymatiques sous l'effet des contaminants.

Un **biomarqueur d'effet** correspond à une altération biologique qui, en fonction de l'intensité de la réponse, peut être associée à une altération possible de l'état physiologique de l'individu (Figure 1), comme des effets sur la croissance ou sur le succès reproducteur. Il révèle l'action des contaminants par la mesure de paramètres biologiques. Ces derniers sont très nombreux et variés suivant le niveau biologique considéré (biochimique, cellulaire, physiologique...). Contrairement aux biomarqueurs d'exposition, ces biomarqueurs ne sont pas spécifiques d'un polluant, mais intègrent plutôt tous les types de toxicités complexes.

Un **biomarqueur de sensibilité/susceptibilité** utilise la mise en évidence de caractères de résistance d'origine génétique des organismes à certains contaminants, comme la synthèse d'enzymes moins sensibles ou une augmentation du pouvoir de détoxification (résistance des insectes aux pesticides).

Cette classification, si elle est couramment employée, doit être maniée avec prudence du fait de la limite souvent floue entre exposition et effet, surtout lorsque l'on considère des organismes aquatiques dont la physiologie est souvent peu connue. Un exemple, montrant les limites de cette classification, concerne les dommages physiques à l'ADN. Ceux-ci peuvent être considérés comme biomarqueurs d'effets, puisqu'ils signalent des atteintes de l'intégrité cellulaire, mais ils peuvent également être considérés comme biomarqueurs d'exposition à des composés génotoxiques (macro-adduits lors de l'exposition à des hydrocarbures).

Les biomarqueurs ne sont pas seulement limités aux études en laboratoire, ils sont également utilisés lors d'études *in situ*. Ils permettent donc de réaliser des études d'écotoxicité des substances chimiques (« *chemical testing* ») et de surveillance environnementale (« *biomonitoring* »).

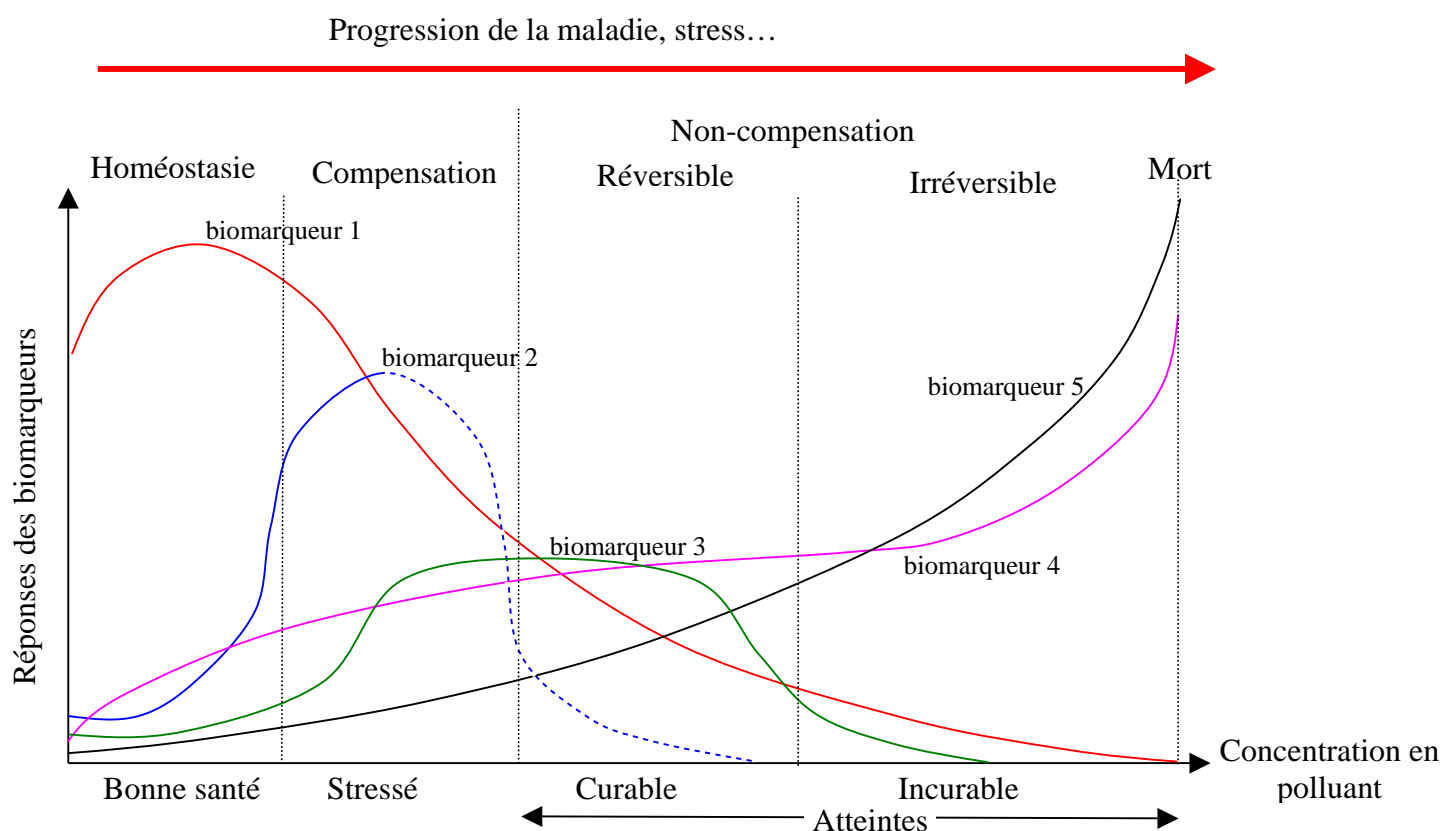


Figure 2 : Progression de l'état de santé d'un individu à l'exposition d'une augmentation de la concentration d'un polluant (Allen & Moore, 2004).

Les biomarqueurs 1 à 3 peuvent correspondre aux biomarqueurs d'exposition et 4 et 5 aux biomarqueurs d'effets.

I.A.3 Les approches multimarqueurs

Les batteries de biomarqueurs sont de plus en plus utilisées pour évaluer les effets de l'exposition d'organismes à des xénobiotiques. L'approche multimarqueurs peut être considérée comme similaire aux procédures utilisées en épidémiologie humaine ; plusieurs types d'analyses sont nécessaires pour effectuer un diagnostic. Cette intégration de plusieurs réponses, situées à divers niveaux d'intégration (moléculaire, cellulaire,...) et temporels (cascades enzymatiques,...), permet le développement de systèmes d'alertes de contamination environnementale.

Face aux besoins d'outils simples et opérationnels pour évaluer la qualité des eaux et à la complexité d'interprétation des données de terrain sur la mesure des biomarqueurs, différents systèmes de traitements des données ont été développés pour les gestionnaires environnementaux et pour intégrer les biomarqueurs dans le contrôle environnemental :

- Beliaeff et Burgeot (Beliaeff & Burgeot, 2002) ont décrit une méthode simple, permettant de résumer graphiquement les réponses des biomarqueurs afin d'en faciliter l'interprétation. Les réponses des biomarqueurs sont illustrées par une représentation radar ; l'aire alors définie va permettre de réaliser une réponse intégrée.

- Une méthode rapide pour l'évaluation de la pollution marine (RAMP) (Galloway, *et al.*, 2002) intègre 3 techniques complémentaires de biomarqueurs (le contrôle cardiaque des invertébrés et le test du rouge neutre sont des indicateurs de stress généraux, l'inhibition de l'acétylcholinestérase est un indicateur d'exposition aux pesticides organophosphorés et carbamates) en compléments de l'utilisation de kits d'immuno-dosage.

- Une autre approche « *Expert System* » (Viarengo, *et al.*, 2000) est capable d'intégrer une batterie de biomarqueurs d'exposition et d'effets, mesurés à différents niveaux (des gènes jusqu'aux tissus) et de prendre en compte leurs interférences possibles. Cette approche a été développée dans le cadre du projet européen BEEP (EVK3-2000-00543). Ce système classe les niveaux de syndromes de stress induits par une pollution. *Expert System* peut contribuer à une méthodologie générale pour le traitement des données, dans des sites très pollués et dans les zones de gradient de pollution.

- Les recherches du LPTC, qui ont concerné plusieurs espèces (mollusques, poissons, rats, vers de terre) (Antignac, *et al.*, 1990; Ribera, *et al.*, 1991; Labrot, *et al.*, 1999; Ribera, *et al.*, 2001), ont été basées sur une approche multimarqueurs (Narbonne, *et al.*, 1999b): la palette de biomarqueurs d'exposition étudiés a permis de différencier les types de contaminants et de déterminer leur nature. Les signatures biologiques de plusieurs contaminants ont été établies (études en laboratoire), les activités ont été caractérisées au niveau fondamental (PChE, GST), et des études de terrain ont permis de vérifier la sensibilité et la robustesse des protocoles développés. L'échelle indiciaire multimarqueurs a été adaptée à partir du système d'évaluation de la qualité des eaux (SEQ) des Agences de l'Eau. Les biomarqueurs intégrant l'échelle doivent être représentatifs des différentes fonctions biologiques. Pour chaque site étudié, 5 biomarqueurs d'exposition sont sélectionnés parmi 5 catégories : 4 de contaminations (métaux lourds, HAP, produits organiques, pesticides) et 1 de stress non spécifique. Les résultats du dosage des biomarqueurs d'exposition sont regroupés et leur pouvoir discriminant est calculé par une analyse de classement. Pour chaque site, chacun des biomarqueurs reçoit une valeur prédéfinie (Narbonne, *et al.*, 1999c). L'échelle de pollution est alors construite en effectuant la somme des valeurs données pour chacun des biomarqueurs, à chaque site. A chaque gamme de valeur correspond une couleur (bleu à rouge) permettant de visualiser les sites en fonction de leur niveau de pollution (Figure 3). Les programmes européens de ces dernières années (BIOMAR, BEEP), ou de contrôle de contamination/assainissement du milieu lors de marées noires telle celle de l'Erika (Clérandeau, *et al.*, 2003), ont permis d'utiliser ce type d'approche globale multimarqueurs comme diagnostic du niveau de pollution du milieu marin. Ce type de procédure a également été utilisé en eau douce, avec des poissons (programme FishBio de l'Agence de l'Eau Adour-Garonne (Aarab, *et al.*, 2004a)) et commence à être utilisé par d'autres équipes (Banni, *et al.*, 2005).

- L'indice d'évaluation de la santé (*health assessment effect*) (Adams, *et al.*, 1993) est un indice quantitatif permettant les comparaisons statistiques de la santé des animaux évaluée à partir d'une base de données. Cet indice a été fabriqué pour donner une information générale sur l'état de santé des populations de poissons.

- L'indice d'évaluation d'effet biologique (*bioeffect assessment index*) (Broeg, *et al.*, 2005) a été conçu pour le flet (*Platichthys flesus* (L.)), afin d'évaluer la situation de contamination multifactorielle des milieux côtiers et n'inclue que des biomarqueurs généraux de toxicité. Il regroupe des biomarqueurs issus de différents niveaux d'organisation biologique ; de la molécule à l'individu.

La validation des biomarqueurs s'est effectuée, dans le milieu naturel, au cours de programmes de recherches intégrés et pluridisciplinaires visant la biosurveillance de l'environnement aquatique.

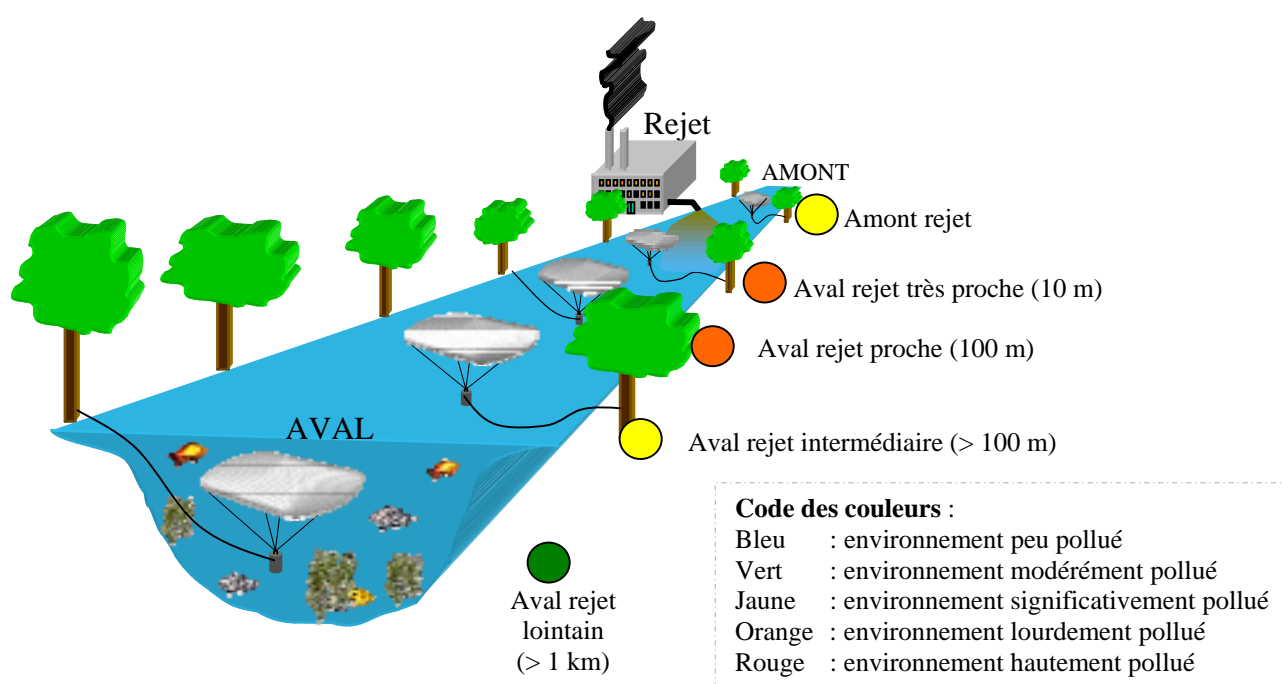


Figure 3 : Gradient de pollution déterminé à l'aide de l'échelle indiciaire multimarqueurs sur une rivière autour d'un rejet (Vidal, 2001).

Des mollusques (*Corbicula fluminea*) ont été placés dans des cages en amont et en aval d'un rejet. Pour chaque lot, les mêmes biomarqueurs ont été dosés : la lipoperoxydation (dosage du malonedialdéhyde), l'activité de la catalase, de la propionylcholinestérase et de la glutathion *S*-transférase (Vidal, *et al.*, 2001a).

I.B Contexte de l'étude

La protection de l'environnement, après être devenue une préoccupation sociale, fait partie désormais des enjeux politiques et économiques de premier plan. De ce fait, les réglementations françaises et européennes ont introduit dans leur droit la notion d'évaluation et de contrôle des risques. De même le concept d'impact sur les composantes biologiques de l'écosystème, notamment en milieu aquatique, a été défini.

La Directive Cadre Eau (directive 2000/60/CE du Parlement Européen et du Conseil établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau), dont les éléments seront repris dans la future loi française sur l'eau (projet de loi adopté le 14 avril 2005), fixe des objectifs ambitieux pour l'ensemble des écosystèmes aquatiques. Il s'agit d'atteindre, dès 2015 et grâce à un programme de mesures et d'actions, un bon état pour les milieux aquatiques superficiels (eaux continentales, estuariennes et côtières). Le Ministère de l'Environnement français souhaite notamment dans cette optique :

- améliorer la connaissance des contaminations et de leurs effets,
- développer la recherche publique dans les domaines de l'épidémiologie et l'écotoxicologie,
- renforcer les mesures réglementaires notamment pour les autorisations de mise sur le marché des produits.

La Directive Cadre Eau (DCE) a pour objectifs de restaurer la qualité écologique des écosystèmes, y compris les zones humides, et d'assurer les usages de l'eau liés à la santé publique en toute sécurité (eau potable, loisirs, conchyliculture,...). Le contrôle de l'efficacité des actions de restauration qui seront engagées et la surveillance générale des milieux aquatiques seront essentiellement fondés sur un suivi de variables biologiques représentatives de l'état des milieux aquatiques et harmonisés au niveau européen. Par ailleurs, afin de réduire les risques pour l'environnement et la santé publique, la DCE dresse une liste de 33 substances dangereuses dont les rejets devront être supprimés d'ici 2020 ou dont la concentration dans les milieux aquatiques devront respecter des normes de qualité environnementale (NQE) dans les eaux, les sédiments et la matière vivante. Mais l'homme utilise de nombreuses autres substances toxiques pour produire des biens de consommation, pour fiabiliser le rendement de cultures, pour l'entretien des espaces et même pour ses besoins personnels. Des centaines de substances nouvelles et de toutes natures sont introduites chaque année et peuvent contaminer les milieux aquatiques à de très faibles concentrations (micropolluants) souvent indécélables par des méthodes analytiques classiques mais dont les impacts biologiques peuvent être avérés.

Il apparaît que l'utilisation d'indicateurs biologiques, tels les biomarqueurs, peut contribuer à une meilleure connaissance générale des niveaux de contamination par les polluants et de leurs impacts potentiels sur la faune et la flore aquatique. Les biomarqueurs peuvent ainsi compléter les évaluations analytiques classiques, notamment lorsque les méthodes de détections restent peu performantes, voire même les remplacer. Ils donnent alors des indications sur des contaminations même très faibles et sur leurs impacts prévisibles chez les organismes vivants. Les biomarqueurs sont donc à considérer comme outils potentiels de gestion environnementale qui nécessitent encore de nombreux développements afin qu'ils puissent être utilisés en routine et mis à la disposition des gestionnaires et acteurs de l'eau.

Ces dispositions imposent une surveillance accrue des rejets et l'étude de leurs impacts.

La collaboration développée au cours des années passées, entre le Laboratoire de Toxicologie Biochimique (LPTC) et le Groupement de Recherche de Lacq (GRL) (devenu Pôle de Recherche Mont/Lacq) a permis des avancées majeures dans la mise au point de ces nouvelles approches multi-biomarqueurs en milieu dulçaquicole.

Le projet des Rivières Pilotes (mésocosmes ouverts du groupe TOTAL à Lacq) permet, dans une logique de recherche et de développement, de participer à l'élaboration des outils nécessaires à cette tâche pour leur utilisation future. En effet, il n'existe que peu d'indicateurs biologiques fiables et normalisés à la disposition des institutions réglementaires. Un projet de validation d'indicateurs

biologiques en eau douce a été développé en mésocosme : l'étude des biomarqueurs chez la palourde asiatique *Corbicula fluminea*.

La palourde asiatique *C. fluminea* (M.) a fait l'objet de nombreux travaux afin d'être utilisée comme espèce sentinelle pour la surveillance des milieux dulçaquicoles (Tatem, 1986; Basack, *et al.*, 1998; Barfield, *et al.*, 2001). Elle s'est, en effet, très largement répandue dans le grand Sud-Ouest de la France dans des habitats variés, lotiques ou lenticues, grâce à sa très grande adaptabilité et compétitivité, comme l'a fait une autre espèce de bivalve, la moule zébrée (*Dreissena polymorpha*) dans le Nord-Est. *C. fluminea* a été employée dans de nombreuses études visant à déterminer ses capacités en tant que bioaccumulateur potentiel à développer les biomarqueurs d'exposition tels que l'inhibition des cholinestérases (Mora, *et al.*, 1999b), l'activation des glutathion *S*-transférases (Vidal, *et al.*, 2001b) ou des métallothionéines (Baudrimont, *et al.*, 1997a). Certains de ces biomarqueurs d'exposition (activités NADPH réductase, glutathion *S*-transférase, propionylcholine-estérase, catalase) ont fait l'objet de validations lors d'exposition en rivières artificielles (Bassères, *et al.*, 2004) pour être utilisés *in situ*, intégrés à l'échelle indiciaire multimarqueurs (MPI), et pour effectuer des comparaisons avec d'autres indices (réponses biocénologiques) afin de mieux cerner les impacts des contaminants sur le milieu aquatique dulçaquicole (Figure 3).

Notre travail s'inscrit dans la continuité de cette démarche, à la suite du développement et de l'utilisation des biomarqueurs d'exposition chez *C. fluminea* (M.) (Vidal, 2001) en tant qu'espèce sentinelle.

I.C Objectifs

La validité d'un biomarqueur (exposition) tient à trois caractéristiques principales : spécificité, sensibilité et précocité. Il apparaît, de plus en plus, que la spécificité des marqueurs biochimiques est très relative. Ainsi, l'inhibition de l'acétylcholine estérase (AChE), longtemps considérée comme due à la présence d'organophosphorés (De La Vega Salazar, *et al.*, 1997) et de carbamates (Perkins & Schlenk, 2000), peut également répondre significativement aux métaux (Dethloff, *et al.*, 1999). Les molécules biologiques, proposées comme biomarqueurs, participent à des processus physiologiques normaux et sont donc soumises à des variations liées aux facteurs naturels, indépendamment de toute contamination. Un intérêt majeur des biomarqueurs serait de révéler des contaminations faibles du milieu avant que celles-ci n'aient eu un impact écosystémique. Dans cet objectif, les marqueurs biochimiques paraissent particulièrement pertinents puisque la dose nécessaire pour produire un effet est d'autant plus faible que l'on s'adresse à un niveau d'organisation biologique moins élevé. Lors d'une contamination du milieu, la rencontre initiale entre le xénobiotique et l'organisme intervient au niveau des macromolécules biologiques. On peut donc s'attendre à ce que les marqueurs biochimiques (biomarqueurs d'exposition) soient ceux qui manifestent la réponse biologique la plus précoce. Toutefois, lorsque l'organisme répond à la présence de contaminants par l'induction de protéines spécifiques, il est possible que, lors d'expositions intenses, cette synthèse soit réduite (partie en pointillée de la courbe de réponse du biomarqueur n°2 - Figure 2) du fait de la trop grande toxicité qui s'exerce sur l'organisme. Cette diminution générale du métabolisme peut être à l'origine de faux négatifs et entraîner des erreurs d'interprétation.

Peu d'études ont tenté de mettre en relation les effets biologiques observés aux différents niveaux d'organisation biologique, et les populations et communautés, et de ce fait, la signification écologique des biomarqueurs reste un sujet de discussion (De Coen & Janssen, 2003; Hyne & Maher, 2003; Vasseur & Cossu-Leguille, 2003). La réponse de certains biomarqueurs peut refléter un processus adaptatif tandis que d'autres révèlent un effet néfaste pouvant avoir un retentissement aux niveaux individuel et supra-individuel. C'est le cas des biomarqueurs d'effets qui, bien qu'apparaissant plus tardivement en comparaison avec les biomarqueurs d'exposition (Figure 2), reflètent l'augmentation du stress de l'animal, jusqu'à l'effet le plus délétère, la mort de l'individu. On peut s'attendre à ce qu'entre temps, par exemple, l'inhibition de l'AChE (au travers de ses effets neurotoxiques et potentiellement comportementaux), les perturbations endocriniennes (en particulier des hormones impliquées dans la reproduction) ou les effets génotoxiques aient un retentissement au niveau des populations, voire des communautés et des écosystèmes.

Comme nous l'avons vu, les biomarqueurs d'exposition permettent d'obtenir une réponse précoce à la présence de contaminants dans une certaine gamme de concentrations sublétales. La connaissance de l'état physiologique de l'animal permettrait de mieux définir la zone de toxicité aiguë. Il est donc nécessaire de répondre à certaines questions :

- est-il possible de définir le statut physiologique d'un organisme suite à des altérations induites par une pollution, grâce à l'utilisation d'une série de biomarqueurs se situant à différents niveaux d'organisation d'un individu ?
- la progression de ces altérations est-elle détectable par la réponse des biomarqueurs ?

L'objectif principal de cette étude prospective est de mettre en place des marqueurs susceptibles de servir de base à des biomarqueurs d'effets chez *C. fluminea*. Pour cela, il convient de privilégier les approches multifonctionnelles. En effet, les biomarqueurs sont regroupés selon la fonction physiologique à laquelle ils appartiennent (reproduction, génétique, immunité, système nerveux ...). Pour être utilisés comme biomarqueur d'effets, les marqueurs sélectionnés devront montrer qu'ils peuvent être reproductibles et être prédictifs de la mortalité des individus et/ou des réponses des biocénoses.

Le développement et la validation de nouveaux biomarqueurs à partir des données de l'écotoxicologie fondamentale comportent plusieurs étapes :

- sélection d'une espèce sentinelle,
Les indicateurs biologiques choisis comme espèces sentinelles, pour pouvoir donner des informations sur l'état de l'écosystème, doivent satisfaire à plusieurs règles (Hopkin, 1989) : **la pertinence** (ils doivent avoir un rôle important dans le fonctionnement de l'écosystème), **la fiabilité** (ils doivent avoir une large distribution, être communs et faciles à prélever), **la robustesse** (ils ne doivent pas succomber à de faibles doses de polluants et résister aux conditions en laboratoire), **la sensibilité** (ils doivent présenter des réponses mesurables : concentrations des polluants dans les tissus, perturbation de caractéristiques biologiques mesurables), **la reproductibilité** (leurs réponses doivent être similaires avec des doses identiques de polluant dans des sites différents). Au cours de recherches au sein du laboratoire, la palourde d'eau douce *C. fluminea* (M.) a commencé à être utilisée lors d'expérimentations de transplantation (années quatre-vingt-dix) à cause de sa robustesse, contrairement à d'autres espèces étudiées en parallèle (*Anodonta* sp.). Les études menées par la suite sur *C. fluminea* ont permis de la proposer, puis de la confirmer en tant qu'espèce sentinelle (Labrot, 1996; Mora, 1998; Vidal, 2001).
- sélection des marqueurs,
Dans la cascade des événements se produisant lors du contact d'un organisme avec un contaminant, les biomarqueurs d'exposition indiquent à quoi est exposé un organisme. Il va s'agir de sélectionner des marqueurs parmi les grandes fonctions (immunité, reproduction,...) susceptibles de devenir un biomarqueur d'effets chez *C. fluminea*, afin de déterminer si les altérations fonctionnelles peuvent avoir des conséquences sur l'écosystème.
- mise au point de la méthode de dosage,
Les mesures, des marqueurs susceptibles de devenir des biomarqueurs d'effets, sont régulièrement utilisées en routine sur d'autres types d'organisme. Il va s'agir de les adapter et de les développer sur *C. fluminea*.
- caractérisation de la relation dose/effet (laboratoire)
- validation en mésocosme / expérimentation in situ,
- gestions des données (intégration dans une approche de type multimarqueurs).

Après avoir estimé l'état de contamination de l'environnement avec les contaminants majeurs qui s'y retrouvent, et pris connaissance de façon détaillée des caractéristiques de l'espèce étudiée (*C. fluminea*), nous verrons dans un premier temps quel type de biomarqueurs peuvent être utilisés pour chaque grande fonction. Une revue bibliographique nous permettra de les replacer dans leur contexte.

Dans un second temps, nous étudierons le développement proprement dit de ces marqueurs, avec dans une première partie la phase expérimentale en conditions contrôlées (expositions *in vitro* et en aquariums), afin d'en déterminer la pertinence et leur application possible. Dans une seconde partie, nous évaluerons leur application et leur validation en conditions semi-contrôlées (mésocosmes) pour déterminer si leurs réponses sont prédictives de la mortalité des individus et des perturbations induites aux niveaux des populations et des communautés.

I.C.1 Les polluants dans l'environnement

Chaque année, des milliers de tonnes de polluants sont déversés dans les eaux et les sols. Les contaminants majeurs rencontrés dans l'environnement sont les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les polychlorobiphényles (PCB), les pesticides et les métaux (Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin, 1988). Ils proviennent des rejets des différentes activités industrielles (effluents, fumées) et domestiques (combustion, gaz d'échappement) (Figure 4).

Le transfert de ces composés est essentiellement dû au lessivage des sols et des eaux de ruissellement qui drainent vers les zones aquatiques des quantités importantes de produits et de résidus. Les contaminants peuvent alors s'adsorber sur des particules minérales (perte de biodisponibilité, piégeage dans les sédiments). Ils sont capables également de circuler dans les eaux pendant un temps plus ou moins long (substances plus ou moins rémanentes). Durant leur voyage jusqu'à la mer, ils sont susceptibles d'entrer en contact avec des organismes, soit par adsorption soit par absorption. Les contaminants peuvent également être transportés sur des longues distances (*long range transport*) en passant par les courants atmosphériques (Wolff & Peel, 1994).

Parmi tous les xénobiotiques présents dans l'environnement, nous nous intéresserons plus particulièrement à la contamination par trois catégories de contaminants majoritairement présents dans le milieu aquatique : hydrocarbures, pesticides et métaux.

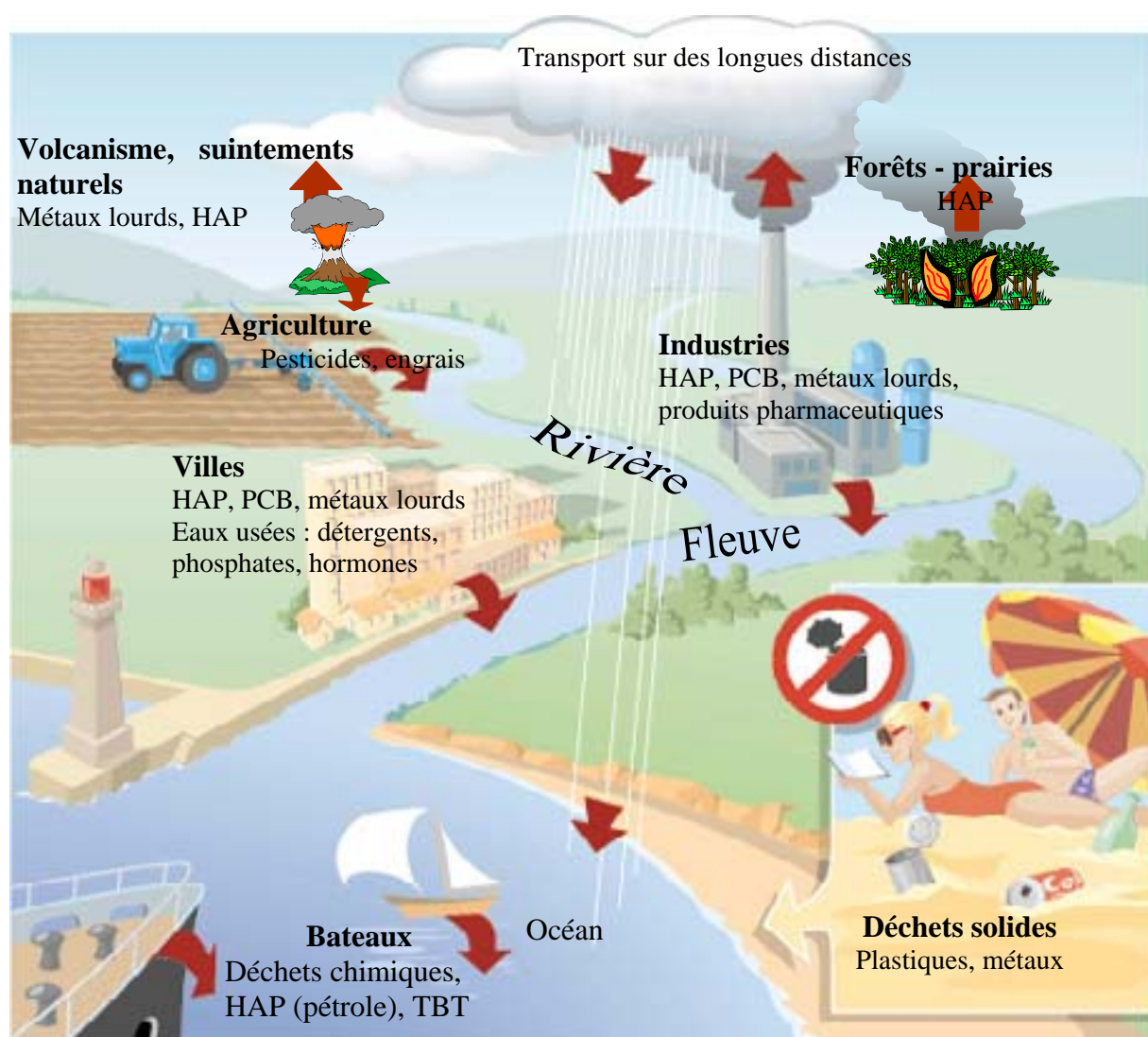


Figure 4 : Sources de pollution dans l'environnement

I.C.2 Contamination par les hydrocarbures

Ce sont des composés qui, par leur structure, leur poids moléculaire et leur polarité, appartiennent à plusieurs familles. Parmi celles-ci, on notera : les alcanes ramifiés ou non, les cycloalcanes, les hydrocarbures oxygénés, azotés ou soufrés, les asphaltènes et résines, les porphyrines sous formes de complexes avec des minéraux tels le nickel et le vanadium, les oléfines, et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Leur présence dans notre environnement a fait l'objet de multiples études (Aarab, *et al.*, 2004b).

Les HAP proviennent de sources multiples que l'on peut classer en deux catégories : les sources naturelles et anthropiques. Certains organismes terrestres et marins peuvent synthétiser un grand nombre d'hydrocarbures qui seront soit excrétés, soit libérés lors de leur mort après décomposition de la matière organique, donnant des hydrocarbures dits d'origine biogène (formation de pétrole). La pyrolyse et/ou la combustion de matières organiques naturelles (feux de forêts et de prairies) ou anthropiques (industrie, combustion de charbons, fuels, essences, kérosènes...) libère divers types d'hydrocarbures. Ceux-ci sont introduits dans les milieux dulçaquicoles *via* l'atmosphère par des retombées sèches ou humides (pluies). La contamination par les hydrocarbures d'origine pétrogénique (activité de production, de transfert, et de transformation des pétroles) représente plus de 6 millions de tonnes par an dans les océans (Mille, *et al.*, 1992).

I.C.3 Les pesticides

Dans une agriculture confrontée aux contraintes économiques, il a fallu intensifier, industrialiser les productions céréalières, maraîchères, fruitières, ainsi que l'élevage. L'évolution des techniques agricoles s'est alors accompagnée de l'utilisation massive de composés en tous genres, d'origine naturelle ou de synthèse (engrais, produits phytosanitaires,...).

Parmi ces composés, on trouve les pesticides qui regroupent des produits de différentes familles chimiques (carbamates, organophosphorés, organochlorés, imidazoles, urées substituées, phénoxyacétiques, organométalliques,...) ayant des modes d'action et des cibles biologiques différentes. On distingue en effet : les insecticides, les molluscicides, les fongicides, les herbicides,... qui permettent de lutter contre toutes sortes de ravageurs, mais qui posent en même temps, de nombreux problèmes (Bouguerra, 1986) :

- contamination des récoltes par ces composés ou leurs résidus,
- efficacité temporaire impliquant des apports répétés,
- les organismes nuisibles peuvent devenir résistants ce qui nécessite l'application de doses plus importantes ou l'utilisation de nouveaux produits,
- leur action n'est pas spécifique : de nombreuses espèces non-cibles peuvent être affectées entraînant un déséquilibre des écosystèmes.

L'agriculture raisonnée et biologique tend à mettre un frein à l'utilisation de ces pesticides. L'arrivée de ces polluants dans l'environnement aquatique et les perturbations qui peuvent en résulter ont fait prendre conscience de la nécessité d'actions de surveillance. Les techniques capables de mesurer un effet physiologique ou biochimique en relation avec la présence d'un toxique représentent des outils indispensables à un tel suivi.

Provenant des épandages agricoles, la quasi-totalité des produits utilisés se retrouve dans l'environnement. Le transfert de ces composés est essentiellement dû au lessivage des terrains agricoles et aux eaux de ruissellement qui drainent vers les zones aquatiques des quantités importantes de ces produits et de leurs résidus.

I.C.4 Les métaux

Le terme de métal regroupe un ensemble d'éléments chimiques qui occupent principalement les colonnes IA et IIA ainsi que les lignes des éléments de transition de la classification périodique.

Ils sont caractérisés par leur propriété à former en présence d'oxygène au moins un oxyde basique. Les métaux constituent des composés naturels des sols et seul leur excès peut être considéré comme une pollution. Il existe des métaux essentiels à la vie qui agissent à faibles doses pour le bon fonctionnement des organismes en participant à de nombreuses réactions enzymatiques et métaboliques ; ce sont les oligo-éléments (fer, cuivre, zinc, manganèse,...). Les métaux qui n'entrent dans aucune fonction biologique connue sont dits non-essentiels ou métaux lourds ; ce sont le cadmium, le mercure, le plomb, l'argent.... En général, ils sont présents dans les tissus sous forme ionique et peuvent se fixer sur de nombreuses molécules biologiques avec une préférence pour les groupements thiols (-SH).

Les métaux lourds sont donc présents dans l'environnement sous différentes formes chimiques qui résultent d'équilibres entre les ions métalliques et les complexes organiques et inorganiques. Leur spéciation est un problème fondamental puisque leur biodisponibilité et leur toxicité dépendront de leurs formes chimiques dans l'eau.

La pollution par le méthylmercure de la baie de Minamata au Japon dans les années 1950-1960 a illustré les risques et les conséquences sur la santé de ce type de contaminants. Dans l'environnement, les contaminations par certains métaux comme le cadmium (Cd), le plomb (Pb) ou le mercure (Hg) sont très importantes. Ces composés, facilement ingérables par l'organisme, peuvent développer une toxicité ayant plusieurs cibles dans les cellules (Posthuma & Van Straalen, 1993, Viarengo, 1989).

La principale voie de détoxification de ces métaux par l'organisme est la synthèse de protéines et de peptides riches en groupements thiols (métalloprotéines et métallothionéines) qui permettront leur fixation et leur excrétion (Baudrimont, *et al.*, 1997b).

Nous nous intéresserons ici plus particulièrement au cas du cadmium, choisi comme contaminant type dans les différentes expositions.

• Cas du cadmium

Le cadmium est un des « métaux traces » existant dans la nature. Contrairement à d'autres métaux traces, celui-ci n'a pas de valeur nutritive connue et est capable de provoquer des effets toxiques.

Le cadmium ($Z = 48$; masse molaire = 112,41 g ; densité = 8,64 g.cm⁻³) est un métal qui fait partie du groupe II B de la classification périodique des éléments. Le cadmium est au 67^{ème} rang d'abondance au sein de la croûte terrestre et se retrouve en association avec le zinc pour un rapport de 1:445.

Les rejets de cadmium dans l'environnement sont essentiellement liés aux activités humaines. Il est essentiellement utilisé dans la fabrication d'accumulateurs ou de batteries, de pigments, de stabilisateurs, dans la galvanoplastie et les alliages.

En 1997, la production primaire mondiale de cadmium était comprise entre 14000 et 16000 tonnes, moins de 5 % du métal utilisé par l'industrie étant recyclé (Cossa & Lassus, 1989; Wright & Welbourn, 1994). Dans les eaux naturelles, le cadmium peut être présent sous forme dissoute, colloïdale et particulaire. La distinction entre ces trois formes est relativement arbitraire et se fait en fonction de la taille des particules. Plusieurs facteurs physico-chimiques et biologiques contrôlent le passage d'une forme à l'autre. En eau douce, le cadmium dissous se trouve principalement sous forme d'ion libre Cd²⁺, avec, selon les conditions physico-chimiques du milieu, la présence d'autres espèces neutres ou chargées : CdCl⁺, CdCl₂, CdSO₄, CdHCO₃⁺, CdCO₃, ... Notons que l'ion libre Cd²⁺ est considéré comme la forme la plus biodisponible pour de nombreuses espèces aquatiques, compte-tenu des mécanismes de transport du métal au travers des membranes cellulaires par l'intermédiaire de transporteurs (canaux calciques potentiel-dépendants) (Foster & Morel, 1982; Morel & Hering, 1993; Fleming, *et al.*, 1998; Andrews, 1999).

Le cadmium est un agent cytotoxique général avec une affinité particulière pour les groupes sulfhydryles et dans une certaine mesure pour les groupes hydroxyles et les ligands contenant de l'azote. Le cadmium est aussi un puissant inhibiteur de plusieurs systèmes enzymatiques.

Le cadmium s'est révélé un métal toxique à haut risque suite à l'apparition, après la seconde guerre mondiale, de la maladie "Itai-Itai", dans le bassin du fleuve Jintsu, au Japon.

Cette maladie invalidante et douloureuse était la conséquence d'une intoxication provoquée par l'ingestion de riz fortement contaminé par des rejets de cadmium d'origine industrielle (usine de retraitement de minerai de zinc). L'absorption de cadmium par voie alimentaire a provoqué des atteintes au niveau du squelette (ostéoporose et pseudo-fractures osseuses) avec des difficultés de déplacement, ainsi que des dysfonctionnements du foie et des reins et des atteintes pulmonaires. Plusieurs études toxicologiques et épidémiologiques ont montré que le cadmium est également impliqué dans plusieurs types de cancers (Aldridge, 1996). Les atteintes biochimiques après une exposition au cadmium sont diverses : stress oxydant, peroxydations lipidiques, inhibition des transports ATP-dépendants, perturbations des fonctions mitochondriales et des enzymes cytosoliques en relation avec les propriétés thioloprives du métal, effets de compétition avec le calcium et le zinc, réactions apoptotiques, ... (Roméo, *et al.*, 2000; Geret, *et al.*, 2002).

Toutefois, plusieurs systèmes cellulaires de "défense" peuvent être mis en place pour minimiser, voire neutraliser, les effets toxiques du cadmium: citons, par exemple, les métallothionéines (MTs), protéines cytosoliques riches en cystéine (30 % environ) dont la biosynthèse peut être induite en réponse à une entrée progressive du métal dans le cytosol, conduisant à une séquestration du cadmium suivie dans certains cas par une élimination *via* la voie lysosomiale (Roesijadi & Robinson, 1994).

I.D L'espèce sentinelle : *Corbicula fluminea*

Corbicula fluminea (Müller) est une espèce asiatique dont le plus ancien fossile, retrouvé au Japon, date du crétacé (-190 à -135 millions d'années) (Keen & Casey, 1969). Probablement introduite en Amérique du Nord par des immigrants asiatiques autour de 1925 (Britton & Morton, 1977), elle n'a cessé de se répandre à travers le continent et est présente dans la plupart des cours d'eau sous le 40°N. Elle a ensuite colonisé l'Amérique du Sud et plus récemment l'Europe occidentale.

En raison de sa large distribution, la détermination spécifique des *Corbicula* sp. a été le sujet de nombreuses controverses car elle était initialement basée sur la forme et la couleur de la coquille. Or de tels critères peuvent varier au sein d'une même espèce en fonction de la niche écologique. Deux espèces ont cependant été reconnues: *Corbicula fluminalis* (Müller, 1774), vivant dans les estuaires et n'incubant pas ses larves et *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) (Figure 5) vivant en eau douce et incubant ses larves (Britton & Morton, 1977).



Figure 5 : *Corbicula fluminea* (M.)

I.D.1 Systématique

Concernant les populations européennes, Araujo, *et al.* (1993) estiment que la plupart des *Corbicula* sp. décrites appartiennent à l'espèce *C. fluminea* dont la systématique est décrite dans le Tableau 1.

Eucaryotes
Opisthochontes - 7
Choano-organismes - 11
Métazoaires - 13
Eumétazoaires - 6
Bilatériens - 10
Protostomiens - 11
Lophotrochozoaires - 2
Eutrochozoaires - 3
Spiraliens - 8
Mollusques - 13
Eumollusques - 4
Conchifères - 6
Ganglioneures - 8
Diasomes - 12
Bivalves - 13
Eulamellibranches
Hétérodontes
Corbiculacés
Corbiculidés
<i>Corbicula</i>
<i>fluminea</i>

Tableau 1 :
Systématique de
Corbicula
fluminea (Müller)
replacée dans la
classification
phylogénétique
du vivant
(Lecointre & Le
Guyader, 2001)
(Les nombres
représentent les
nœuds. Les
divisions
principales sont
indiquées en gras)

I.D.2 Ecologie

On retrouve *C. fluminea* dans les lacs et les rivières dans le sable ou les graviers, mais elle s'accommode des substrats fins et mous, comme les argiles et les limons des fonds vaseux. Les siphons étant très courts, ces bivalves doivent vivre en surface du sédiment (Figure 6) et sont habituellement absents des zones profondes.

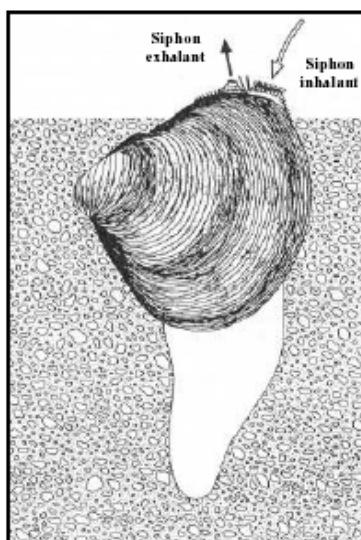


Figure 6 : *C. fluminea* dans sa position naturelle à l'interface sédiment-eau (Britton & Morton, 1982).

Leur population est souvent abondante et la densité peut atteindre jusqu'à 130 000 individus/m² (Eng, 1979) mais le plus souvent se situe autour de 3 000 individus/m². Elle peut atteindre une taille de 5 cm et une longévité de 3 ans. La larve, pédivéligère, permet à l'espèce de se répandre facilement (Britton & Morton, 1982).

Cette espèce est capable de s'adapter à une très large gamme de niches en milieu dulçaquicole (Britton & Morton, 1977) et peut subir de fortes variations des facteurs abiotiques. Elle peut vivre dans des milieux où la salinité atteint 8 ‰, supporte des températures allant de 2 à 35°C (Sickel, 1986) et peut s'adapter dans des biotopes où la saturation en oxygène ne dépasse pas 10 % (Tran, 2001). Cependant, des conditions météorologiques, telles que celles des mois de juillet et août 2003 (forte canicule en France) et leurs conséquences sur les écosystèmes, peuvent réduire très fortement le nombre d'individus dans les populations.

C. fluminea est un organisme filtreur microphage, qui se nourrit préférentiellement d'algues unicellulaires, de débris organiques et de bactéries.

I.D.3 Anatomie, physiologie

C. fluminea, comme tous les bivalves, est constitué de 2 parties distinctes : la coquille, formée de 2 valves, et le corps mou.

Le corps mou regroupe quatre ensembles tissulaires majeurs : le manteau, les branchies, la masse viscérale et le pied (Figure 7, Figure 8).

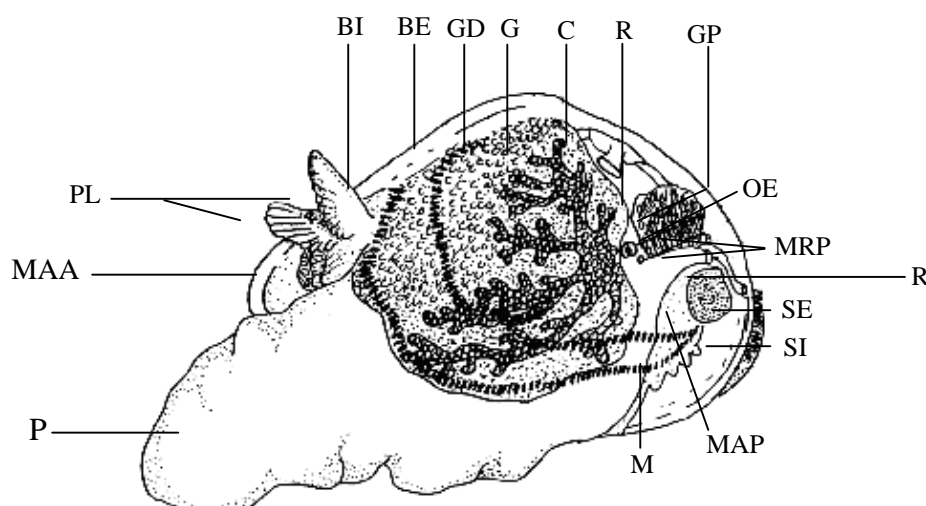


Figure 7 : Anatomie des principaux organes de *C. fluminea*

(**P** : pied ; **MMA** : muscle adducteur antérieur ; **PL** : palpes labiaux ; **BI** : branchie interne ; **BE** : branchie externe ; **GD** : glande digestive ; **G** : gonade ; **C** : cœur ; **R** : rein ; **GP** : gonopore ; **OE** : ouverture excrétoire ; **MRP** : muscle rétracteur pédieux postérieur ; **R** : rectum ; **SE** : siphon exhalant ; **SI** : siphon inhalant ; **MAP** : muscle adducteur postérieur ; **M** : manteau), modifié d'après Araujo, *et al.* (1993).

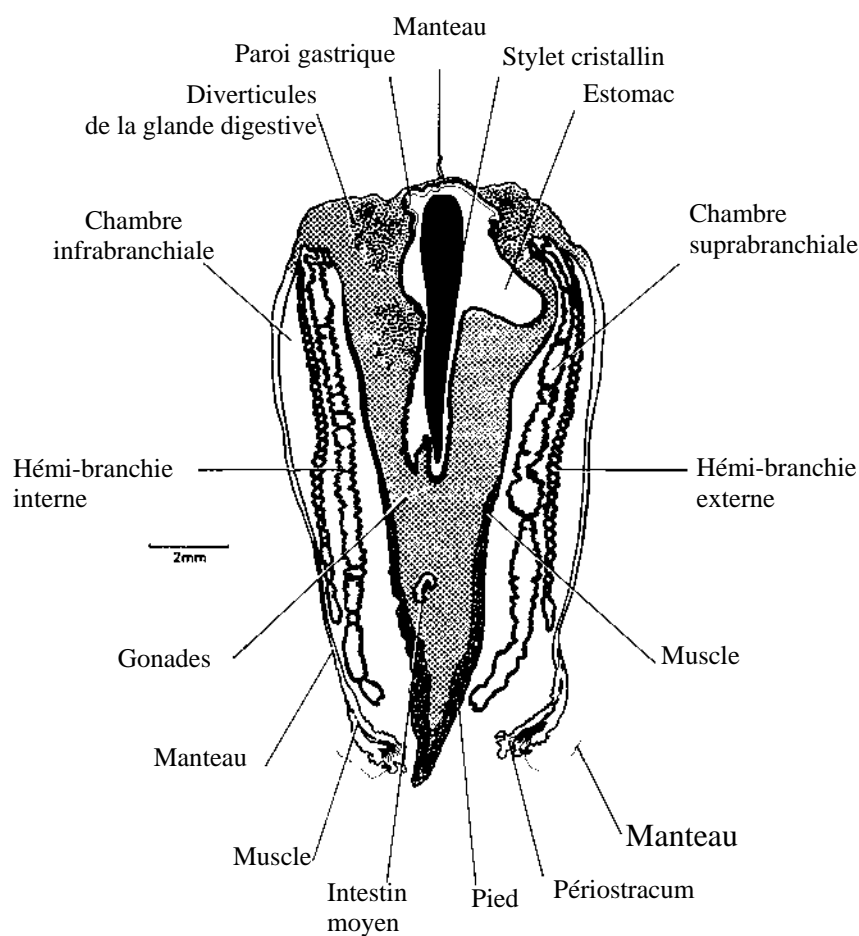


Figure 8 : Coupe sagittale de *C. fluminea* mettant en évidence les principaux organes.

I.D.3.1 Le manteau

C'est un épithélium très mince qui recouvre entièrement la face interne de la coquille et englobe l'ensemble des organes du corps mou. Les deux lobes du manteau fusionnent postéro-latéralement pour former les siphons inhalant et exhalant. Sur les bords externes des siphons se trouvent des cils sensoriels avec des mécano-récepteurs et des chémorécepteurs sensibles à certaines variations du milieu environnant.

I.D.3.2 Les branchies

Chacune des deux branchies (*cténidies*) est formée de deux hémibranchies, la plus interne étant la plus grande. Ces hémibranchies sont constituées de filaments branchiaux sur lesquels se trouvent les cils, à l'origine de l'activité ventilatoire qui permet les échanges respiratoires. L'eau pénètre dans la chambre infrabranche par le siphon inhalant, puis dans les chambres interlamellaires et quitte l'animal par le siphon exhalant *via* la chambre suprabranche. Les particules transportées par l'eau ne peuvent pas pénétrer dans les chambres interlamellaires. Elles sont véhiculées grâce à l'action conjuguée de nombreux cils recouvrant les filaments. Il existe trois types de cils : les cils latéraux, qui créent le courant d'eau à travers les branchies ; les cils latéraux-frontaux, qui retiennent les particules potentiellement nutritives et les conduisent vers les cils frontaux, qui les acheminent vers les palpes labiaux, puis vers la bouche. L'efficacité de rétention est de 100 % pour des particules comprises entre 4 et 20 μm (Way, *et al.*, 1990). Les particules rejetées soit par les branchies, soit par les palpes labiaux, sont véhiculées par les cils recouvrant le manteau vers le siphon inhalant au niveau duquel elles sont libérées dans le milieu extérieur sous forme de pseudo-fèces.

Les branchies possèdent un rôle capital dans la respiration, la nutrition, mais aussi dans la reproduction. Après fécondation, les œufs sont incubés dans la cavité suprabranche, au niveau du feuillet interne de la branchie.

I.D.3.3 La masse viscérale

Ce terme désigne un ensemble de plusieurs organes. **L'appareil digestif** (Figure 8, Figure 9) est composé de la bouche et des 4 palpes labiaux qui l'entourent. Les aliments entrent alors dans l'estomac par l'œsophage et sont transportés vers la paroi gastrique par un courant ciliaire (Figure 9B). L'estomac est entouré par les diverticules de la glande digestive assurant l'absorption et la digestion des particules de nourriture. La paroi interne de l'estomac comprend de multiples zones ciliées assurant un tri entre les petites et les grosses particules. Seules les plus petites sont absorbées, les autres sont acheminées vers l'intestin moyen. Une des caractéristiques de l'estomac est la présence d'un stylet cristallin, condensé d'enzymes digestives qui permet d'assurer la digestion extracellulaire des particules de nourriture et d'agir également comme un pilon afin de fragmenter les particules les plus larges. L'intestin moyen est relié à l'intestin postérieur puis au rectum et à l'anus.

En plus de ce système digestif, la masse viscérale est composée du **système reproducteur** femelle ou mâle. *C. fluminea* est un animal hermaphrodite. En Asie, celle-ci adopte une stratégie d'hermaphroditisme simultané et en Amérique, d'hermaphroditisme protandre (Britton & Morton, 1982).

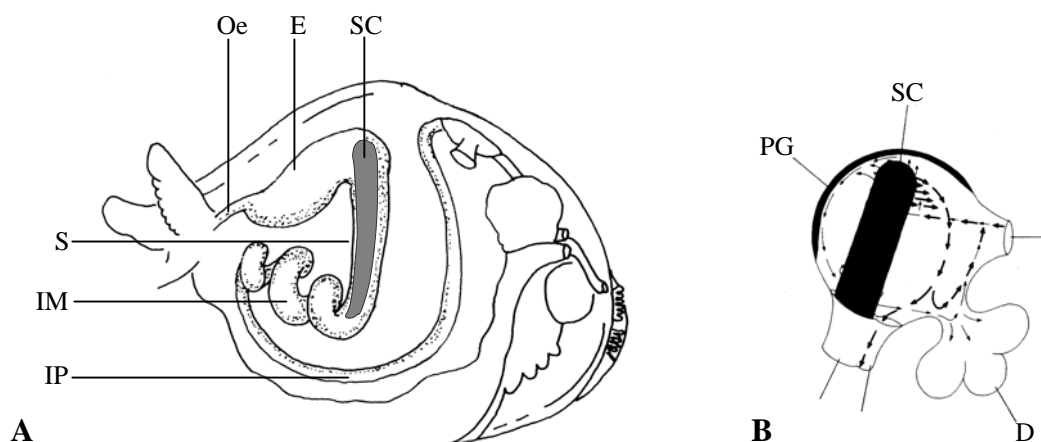


Figure 9 : **A.** Coupe longitudinale de *C. fluminea* mettant en évidence l'appareil digestif. **B.** Détail du chemin des aliments dans l'estomac.

(**IP** : intestin postérieur ; **IM** : intestin moyen ; **S** : sac du stylet cristallin ; **Oe** : œsophage ; **E** : estomac ; **SC** : stylet cristallin ; **D** : diverticule ; **PG** : paroi gastrique) modifié d'après Araujo, *et al.* (1993).

I.D.3.4 Les muscles adducteurs et le pied

C. fluminea possède deux muscles adducteurs : un postérieur et un antérieur. Ils sont à l'origine de l'activité valvaire. Le pied de *C. fluminea* sert à l'enfouissement dans le substrat. Il est très musculéux. Par des phénomènes de turgescence, il se gonfle d'hémolymphe et participe aux mouvements de fouissage, associés à des ouvertures et fermetures brusques des valves. L'ensemble de ces mouvements est utilisé par l'animal pour se positionner à l'interface eau/sédiment. De plus, la surface du pied est ciliée, permettant une remontée des particules nutritives présentes dans le sédiment, de taille relativement grande, lorsque l'animal se trouve dans une eau très pauvre en matières en suspension (algues, bactéries, détritiques organiques) : c'est le "pedal feeding" (Reid, *et al.*, 1992).

I.D.4 Utilisation en tant qu'espèce sentinelle

C. fluminea est un modèle biologique couramment utilisé en écotoxicologie pour des études *in situ*, à partir de populations "sauvages" ou transplantées ("caging") (Baudrimont, *et al.*, 2003) et en laboratoire (Labrot, *et al.*, 1999). Ceci se justifie par plusieurs de ses caractéristiques biologiques et écologiques :

- abondance dans le milieu naturel qui rend facile sa collecte en grandes quantités et la constitution de lots homogènes par sa croissance rapide, son mode de reproduction efficace et sa durée de vie relativement longue (plusieurs années),
- tolérance aux variations physico-chimiques de l'environnement,
- taille suffisante pour permettre une dissection des principaux compartiments tissulaires du corps mou et pour travailler sur un grand nombre d'individus,
- sédentarité et très large répartition géographique,
- activité de filtration, qui le rend capable de bioaccumuler les polluants à l'état de traces dans la colonne d'eau, dans la phase dissoute (contamination par voie directe) ou bien adsorbés sur des particules potentiellement nutritives (contamination par voie trophique),
- leur robustesse permet de les transplanter et de les maintenir en cage sur des sites d'intérêt.

De nombreuses études environnementales, de laboratoire et de terrain, ont été effectuées sur *C. fluminea* (Vidal, *et al.*, 2001a). En raison de sa nature d'organisme filtreur, elle est capable de bioaccumuler des métaux : cadmium (Barfield, *et al.*, 2001), mercure (Inza, *et al.*, 1997), plomb, uranium (Labrot, *et al.*, 1999) mais aussi des polluants organiques : polychlorobiphényles (Tatem, 1986), pentachlorophénols (Basack, *et al.*, 1997), hydrocarbures (Narbonne, *et al.*, 1999a). Ceci a permis d'observer le comportement (Tran, *et al.*, 2002; Tran, *et al.*, 2003; Fournier, E., *et al.*, 2004) et le fonctionnement de biomarqueurs d'exposition (cholinestérases (Mora, *et al.*, 1999a), catalase, lipides peroxydés, glutathion *S*-transférases (Vidal & Narbonne, 2000; Vidal, *et al.*, 2001a), métallothionéines (Baudrimont, *et al.*, 2003)). Ces études ont permis d'utiliser *C. fluminea* pour des suivis saisonniers (Vidal, *et al.*, 2002) et de confirmer son statut d'espèce sentinelle pour l'évaluation d'impacts de rejets industriels en mésocosmes (Bassères, *et al.*, 2004).

Les polluants vont exercer un stress sur l'organisme. Une fois les processus de défense (biomarqueurs d'exposition) dépassés, l'organisme va subir des altérations pathologiques. Ces altérations des grandes fonctions peuvent servir de base pour la sélection des biomarqueurs d'effets. Dans notre étude, nous nous intéresserons à 4 grandes fonctions : génétique, immunologique, reproductive et état général (Tableau 2). Ces fonctions peuvent être observées à 3 niveaux : moléculaire, tissulaire et fonctionnel (Tableau 2). Cette répartition nous permettra de sélectionner une série paramètres à différents niveaux d'organisation, de façon à pouvoir définir le statut physiologique de l'individu en fonction des effets d'une contamination.

I.E Choix des biomarqueurs

Les techniques déjà présentes au LPTC ou la large utilisation de certains biomarqueurs d'effets chez d'autres mollusques principalement chez la moule et l'huître, ont permis d'orienter le choix sur les différents paramètres habituellement mesurés susceptibles de constituer des biomarqueurs d'effets chez *C. fluminea*. Cette étude prospective va nous permettre de développer et d'appliquer ces paramètres chez *C. fluminea*, puis d'en valider la pertinence, afin de les utiliser comme biomarqueurs d'effets. Enfin, nous vérifierons si leurs réponses sont prédictives de la mortalité des individus et des perturbations induites aux niveaux des biocénoses. Ces choix (en gras) sont reportés dans le Tableau 2.

Types d'effets				
	Génotoxicité	Immunotoxicité	Reprotoxicité	Généraux
Niveau moléculaire	Post-labelling Bases oxydées : 8-oxodG Test des comètes Micronoyaux DNA unwinding Cassures simples/ doubles brins	Ig.	Métabolisme de la testostérone Profil hormonal Liaisons ER	Métabolisme glucides protéines lipides
Niveau tissulaire	Foyers tumoraux	Tissus immunitaires	Gonades Gamètes Sex ratio	Tous tissus
Niveau fonctionnel	Expression des gènes (ARN, protéines...)	Immuno- compétence : Macrophages Hémocytes	Vitellogénine ER TTR	Action sur la croissance Stress on stress Réponses lysosomiales Indices de condition Mortalité

Tableau 2 : Répartition des différents biomarqueurs d'effets

La connaissance de chacun de ces biomarqueurs s'avère fondamentale pour leur utilisation ultérieure. Chaque niveau d'effet, et leurs biomarqueurs associés, ont fait l'objet d'une revue bibliographique sur leurs origines, leur formation et leurs conséquences sur l'organisme.

Revue bibliographique

II Synthèse bibliographique

II.A Génotoxicité

II.A.1 La toxicité de l'oxygène

L'oxygène est indispensable aux organismes aérobies, mais certaines formes résultant de la réduction partielle de l'O₂ (Figure 10) peuvent être toxiques en raison de leur grande réactivité pour les macromolécules cellulaires. C'est en 1954 que l'hypothèse sur l'effet endommageant de l'oxygène, dû à la formation de radicaux libres, a été émise (Gerschman, *et al.*, 1954).

Un radical libre (RL) est une espèce chimique (atome ou molécule) dont la structure électronique a la particularité de posséder un électron non apparié encore appelé électron célibataire. C'est la raison pour laquelle ces espèces sont souvent représentées par le symbole R[•]. La présence de cet électron célibataire confère une réactivité très élevée aux radicaux libres qui vont chercher à capturer un électron pour ré-apparier leur électron solitaire. En conséquence, ils vont réagir très rapidement avec toutes les espèces moléculaires voisines, y compris avec les espèces chimiquement stables.

Dans la littérature, on trouve un certain nombre de termes qui font référence aux radicaux libres : ce sont les termes « d'oxyradical » ou de « radical libre de l'oxygène ». En fait, le terme d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) est maintenant préféré car la plupart des espèces désignées possèdent des groupements fonctionnels oxygénés chimiquement actifs. Certaines molécules comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), ne sont pas des radicaux libres *sensus stricto* mais peuvent facilement en générer.

Les ERO sont produites naturellement, soit de manière «accidentelle» par les monooxygénases à cytochrome P450, par les chaînes mitochondriales transporteuses d'électrons, *via* l'auto-oxydation de certaines molécules, soit de manière «délibérée» par des phagocytes activés (Gómez-Mendikute, *et al.*, 2002), des lymphocytes, des fibroblastes, etc...(Halliwell & Cross, 1994). Des facteurs exogènes peuvent également initier la synthèse d'ERO : les radiations ionisantes et certains xénobiotiques dont les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Lemaire & Livingstone, 1993). L'organisme possède naturellement des systèmes de défenses antioxydants lui permettant de piéger ou d'inactiver ces ERO. Cependant, dans certaines conditions ces systèmes ne sont pas suffisants. Ainsi, lorsque l'équilibre entre les forces pro-oxydantes et les défenses antioxydantes est rompu, les cellules subissent un stress oxydatif (Figure 14 p.47).

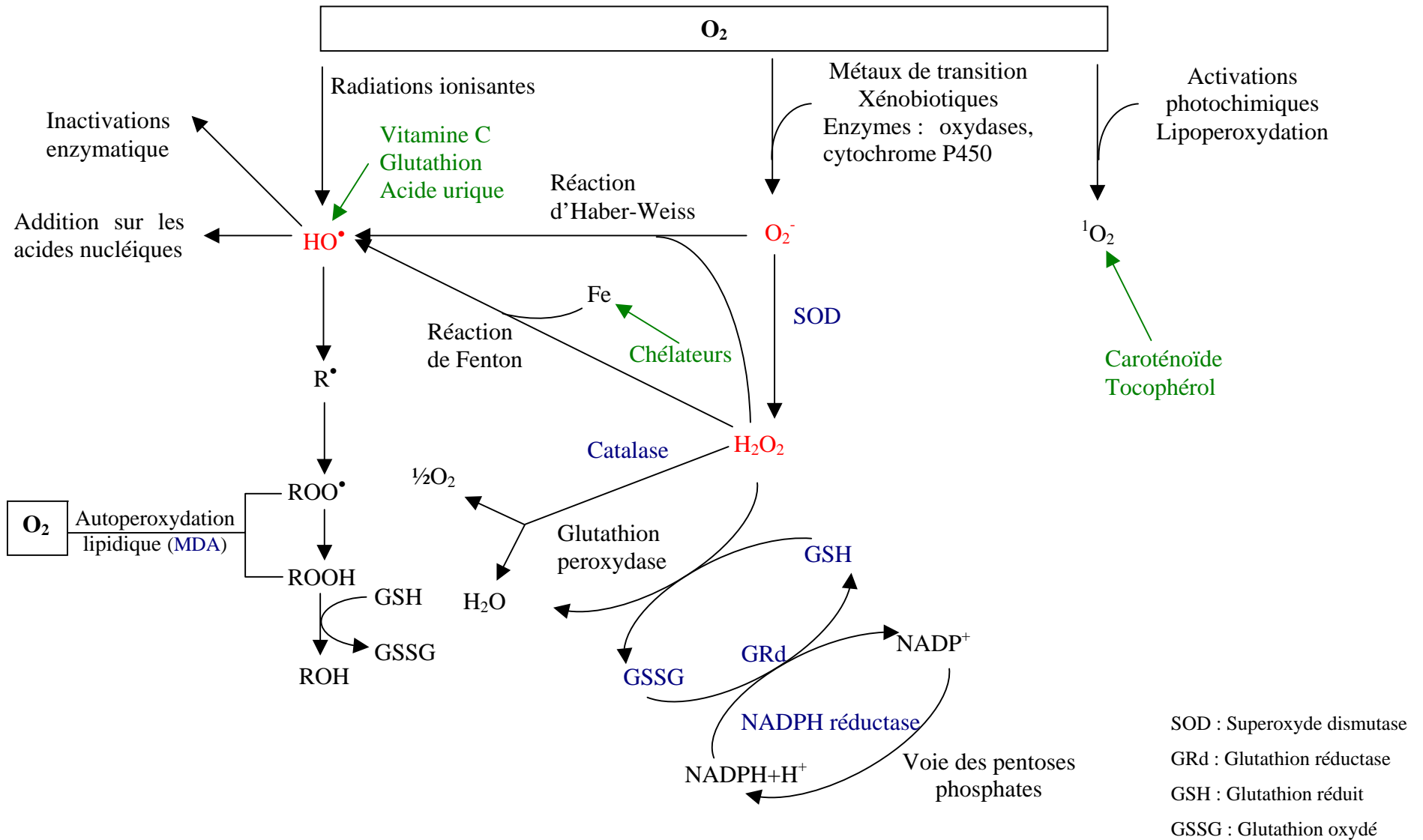


Figure 10 : Origine des espèces réactives de l'oxygène et action des enzymes antioxydantes (Lagadic, *et al.*, 1997 ; Kelly, *et al.*, 1998)
 (les enzymes et composés utilisés en tant que biomarqueurs d'exposition sont indiquées en bleu)

II.A.2 Les espèces réactives de l'oxygène

Parmi les espèces réactives de l'oxygène, on trouve des espèces inorganiques radicalaires ou non radicalaires (anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène) ainsi que des espèces organiques (radicaux peroxyde et alkoxyde).

• L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$)

La molécule d' O_2 à l'état fondamental peut accepter un électron et former le radical anion superoxyde. Il est formé dans quasiment toutes les cellules aérobies (Cadenas & Davies, 2000) (respiration mitochondriale, processus d'inflammation). En effet, dans les organismes vivants, la réduction de O_2 en $O_2^{\bullet -}$ s'effectue principalement au niveau de la chaîne respiratoire des mitochondries. Elle peut également avoir lieu au niveau de la membrane plasmique de cellules du système immunitaire et participer au processus de phagocytose (processus de défense immunitaire entraînant une production accrue d'anions superoxydes). La chimie de l'ion superoxyde diffère selon que la réaction est effectuée en milieu aqueux ou dans des solvants organiques. En environnement apolaire (membranes biologiques), $O_2^{\bullet -}$ se comporte comme une base puissante ou un agent réducteur. $O_2^{\bullet -}$ conduit alors soit au radical peroxyde (HO_2^{\bullet}) soit à une molécule d' O_2 par action avec un radical peroxyde formé au préalable.

L'anion superoxyde peut aussi réagir comme un nucléophile ou comme un agent oxydant mais seulement en présence de composés tels que le catéchol, l'ascorbate ou l' α -tocophérol (vitamine E). En milieu aqueux, l'anion superoxyde est un agent réducteur puissant et il existe une compétition entre les réactions de réduction et sa dismutation (formation de H_2O_2 et O_2). Les effets délétères de $O_2^{\bullet -}$ peuvent être dus à la réaction avec H_2O_2 qui forme $\bullet OH$, très réactif. Cette réaction fut postulée par Haber & Weiss (Haber & Weiss, 1934) en 1934 et n'a lieu qu'en présence d'ions métalliques la catalysant. Des enzymes superoxyde-dismutases (SOD) sont produites par les cellules et éliminent l'anion superoxyde en catalysant sa dismutation. Ces enzymes jouent donc un rôle important dans la survie des organismes en présence d'oxygène en conférant une tolérance à une concentration croissante de O_2 .

• Le peroxyde d'hydrogène

Lorsqu'un second électron s'ajoute à l'anion superoxyde, l'anion peroxyde, O_2^{2-} , est formé. Aux valeurs de pH physiologique, cet anion se protone très rapidement pour former le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 dont le pKa est très élevé. Par ailleurs, sa formation peut avoir lieu par dismutation de l'anion superoxyde en milieux aqueux. Il est faiblement réactif à de faibles concentrations. Par contre, il peut inactiver certaines enzymes telles que la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase à de fortes concentrations. Il peut également conduire à la formation du radical hydroxyle ($\bullet OH$) en réagissant avec l'anion superoxyde selon la réaction d'Haber-Weiss (Haber & Weiss, 1934).

• Le radical hydroxyle

Il peut être issu de la rupture homolytique de la liaison O-O de la molécule de H_2O_2 . Cette rupture peut être obtenue par chauffage ou action de radiations UV et ionisantes. De plus, comme il a été observé par Fenton en 1894, un simple mélange de H_2O_2 et d'un sel de Fer(II) peut aussi

former ces radicaux. Le radical hydroxyle réagit très rapidement avec la plupart des molécules présentes dans les cellules vivantes : sucres, acides aminés, phospholipides, bases de l'ADN et acides organiques. Ces réactions sont de trois types : arrachement d'atome d'hydrogène sur un groupement alkyle, addition sur des structures aromatiques telles que les bases puriques et pyrimidiques de l'ADN, et transfert d'électron. La réactivité des radicaux hydroxyle est telle que, dès leur formation dans la cellule, ils réagissent immédiatement avec les molécules biologiques avoisinantes, produisant alors des radicaux organiques qui peuvent conduire à une perturbation des fonctions cellulaires.

La radiolyse de l'eau conduit à la formation d'une part, de produits radicalaires tels que $\bullet\text{OH}$, électron aqueux (e^-_{aq}) et $\bullet\text{H}$ et d'autre part de produits moléculaires comme H_2O_2 et H_2 . En raison de sa forte réactivité, le radical hydroxyle présente un faible rayon de diffusion, sa réactivité avec les macromolécules cellulaires reste donc limitée à son lieu de production. La diffusion plus élevée de H_2O_2 dans la cellule et la présence de métaux de transition, tels le fer ou le cuivre, assurent une distribution et une production plus large du radical hydroxyle.

• Les radicaux peroxydes

Les radicaux peroxydes sont formés par couplage de l'oxygène moléculaire avec les radicaux libres centrés sur le carbone. Il s'agit d'une réaction extrêmement rapide qui se produit aux tensions en oxygène auxquelles la plupart des cellules sont exposées. Le couplage de O_2 aux radicaux carbone est la première étape de propagation dans l'auto-oxydation des acides gras polyinsaturés des phospholipides, des triglycérides et du cholestérol. La formation de radicaux peroxydes peut être induite par la réaction de $\bullet\text{OH}$ avec les protéines et les acides nucléiques. Une autre voie de production des $\text{ROO}\bullet$ implique la réduction catalysée par les métaux des hydroperoxydes lipidiques en radicaux libres alkoxy ($\text{RO}\bullet$) insaturés qui réagissent avec O_2 pour former les $\text{ROO}\bullet$. Les radicaux peroxydes sont beaucoup plus stables que les autres radicaux de l'oxygène et ont la capacité de diffuser relativement loin de leur site de génération avant de réagir avec une molécule cible (Morrero & Marnett, 1993). La plupart des $\text{ROO}\bullet$ biologiques sont neutres et fortement lipophiles, leur procurant la propriété de pénétrer les cellules et les organites sub-cellulaires. De plus à la différence des autres ERO, ils sont capables de produire des époxydes et des radicaux alkoxy par des réactions d'addition.

II.A.3 Les défenses contre les dommages à l'ADN

Face aux agressions, la cellule met en place des systèmes de défense. Plusieurs mécanismes, non-enzymatiques et enzymatiques, peuvent être mobilisés.

Une classification de ces systèmes de défense a été proposée (Davies, 1988) :

1- les défenses primaires, comprenant à la fois les composés antioxydants (vitamines E, A et C, glutathion et acide urique) et les systèmes enzymatiques, propres à l'organisme, lui permettant de lutter contre les ERO en catalysant des réactions qui les piègeront (superoxyde dismutase, catalase, peroxydases) (Figure 10). Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui, lorsqu'elle est présente à de faibles concentrations par rapport à celles d'un substrat oxydable, retarde considérablement ou inhibe l'oxydation de ce dernier (Gutteridge, 1995).

2- les défenses secondaires : la cellule possède deux stratégies d'action face aux dommages de l'ADN : soit elle répare et resynthétise (systèmes de réparation réputés «sans erreur» : enzymes lipolytiques et protéolytiques, enzymes de réparation de l'ADN), soit le cycle cellulaire n'est pas arrêté et elle met en œuvre une réparation qui peut être fautive (systèmes de tolérance qui évitent l'apoptose mais qui peuvent induire des mutations).

II.A.4 Les dommages à l'ADN

Les espèces réactives de l'oxygène peuvent causer des dommages oxydatifs à l'ADN, à la fois nucléaire et mitochondrial.

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est présent dans toutes les cellules et constitue le patrimoine génétique d'une espèce. Il contient toutes les informations permettant la pérennité d'une espèce par la transmission des caractères héréditaires et le développement de l'individu au travers du développement de chaque cellule et ce par la synthèse continue de protéines dont la nature et les propriétés fonctionnelles sont établies précisément.

La formation de dommages oxydatifs à l'ADN (Figure 11) n'est possible que pour les ERO, $^1\text{O}_2$, H_2O_2 et $\cdot\text{OH}$ qui possèdent l'énergie suffisante à l'induction de dommages (Figure 12) : cassures simples ou doubles brins (Yu & Anderson, 1997 ; Jacobi, *et al.*, 1998), sites abasiques *via* l'oxydation du désoxyribose en C1' ou C2' et relargage de la base adjacente (Ramana, *et al.*, 1998), modification de bases (Cadet, *et al.*, 1999), pontage de protéines avec l'ADN (Dizdaroglu, 1998).

Nous nous limiterons néanmoins à l'étude exclusive de l'oxydation des bases de l'ADN et plus précisément à celle de l'oxydation de la 2'-désoxyguanosine.

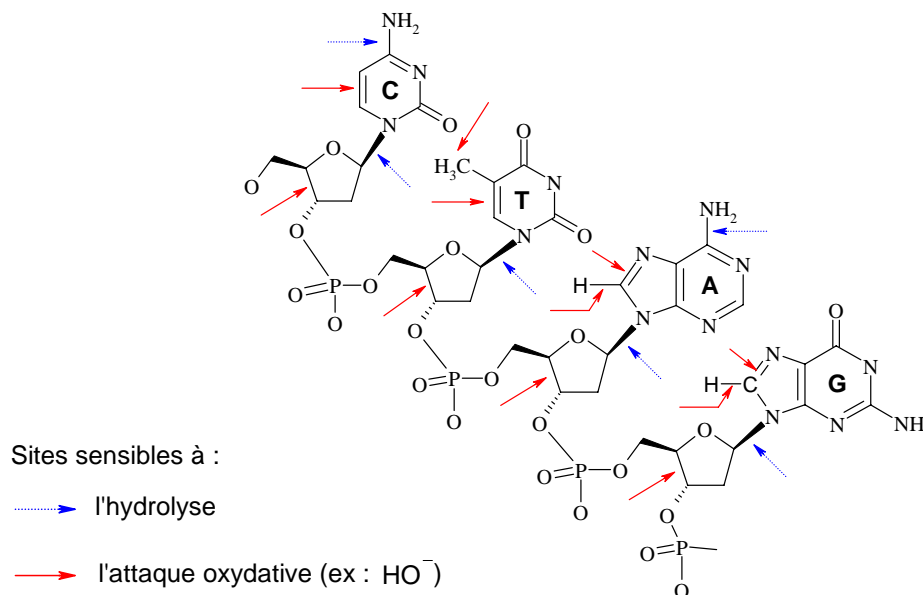


Figure 11 : Représentation schématique des sites sensibles à l'oxydation sur l'ADN (Halliwell & Aruoma, 1991) .

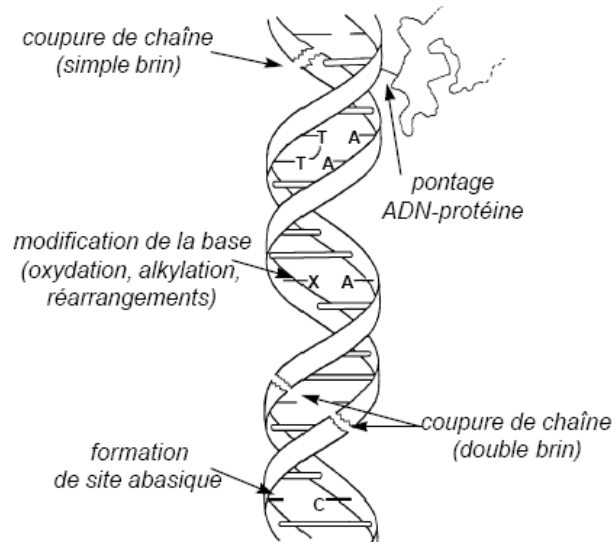


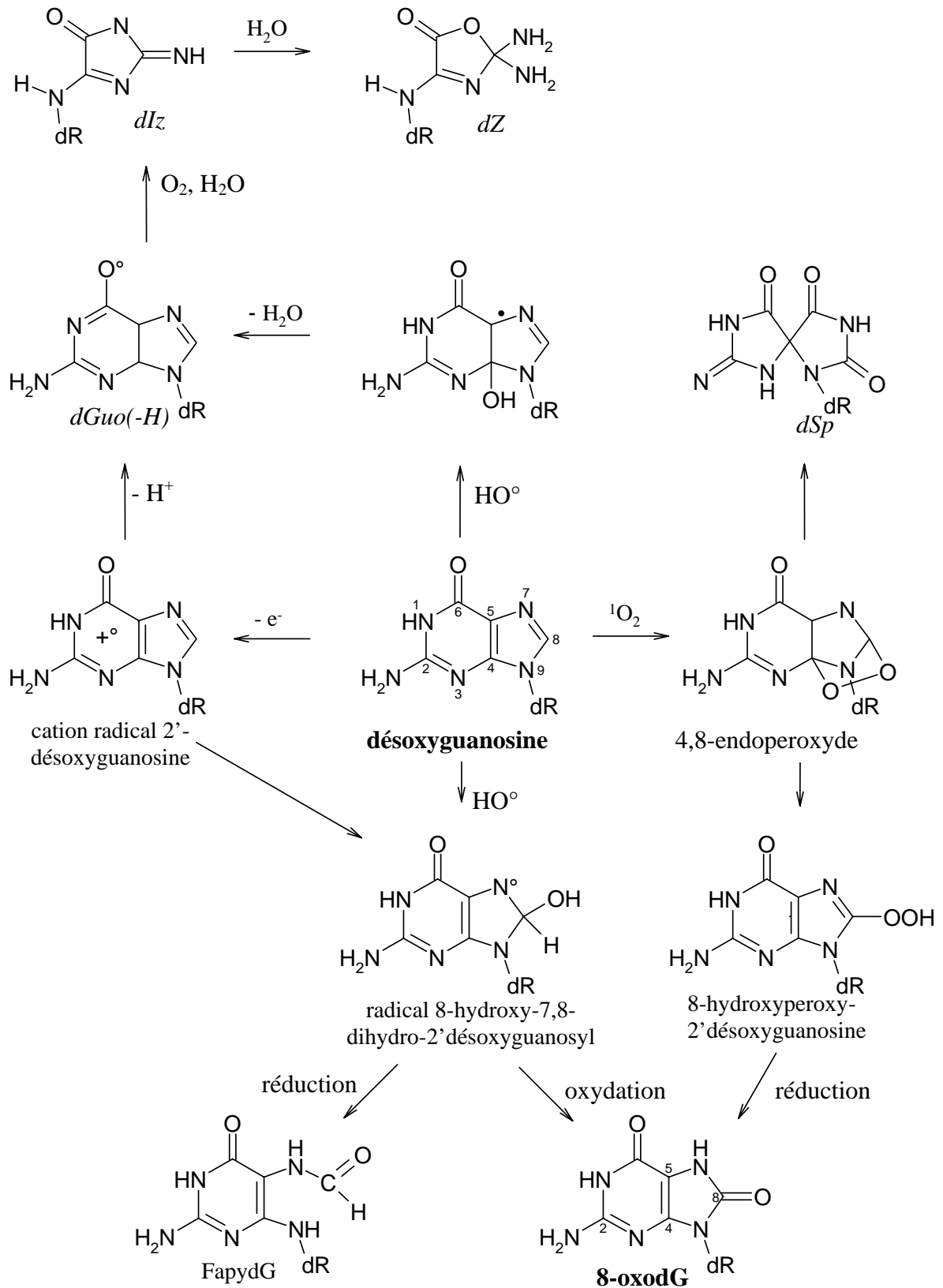
Figure 12 : Principaux dommages à l'ADN

• Cas de la formation de la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine

Parmi les biomarqueurs d'effets à une contamination environnementale, les biomarqueurs de génotoxicité sont étudiés depuis peu comme indicateurs précoces des effets engendrés par les polluants au niveau de l'ADN. Les bases modifiées de l'ADN résultent des réactions avec les espèces réactives de l'oxygène. Un de ces produits est la 8-oxo-7,8-dihydroxy-2'-désoxyguanosine. La 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine (8-oxodG), ou également désigné 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG), est produite *via* les métaux par des réactions de Fenton (Cu, Fe, Cd...) (Lloyd & Phillips, 1999) ou lors de l'exposition de l'ADN *in vitro* aux rayons X (Lagorio, *et al.*, 1994), gamma (Dizdaroglu, 1985) et UV (Ito, *et al.*, 1993; Griffiths, *et al.*, 1998) ou aux molécules favorisant la formation de radicaux libres (Chung, *et al.*, 1992; Murata-Kamiya, *et al.*, 1995; Bolton, *et al.*, 2000; Beddowes, *et al.*, 2003) (Figure 15).

Parmi les multiples lésions oxydatives de l'ADN, la 8-hydroxylation de la désoxyguanosine est la plus abondante. Elle représente à elle seule 5% des dommages oxydatifs causés sur l'ADN. Cette lésion qui résulte de l'addition en C8 du radical hydroxyle a été détectée aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Le radical intermédiaire formé lors de l'addition du radical hydroxyle en C8 peut également conduire par ouverture du cycle à la formation de la 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine ou FapydG (FapyGua).

Il a été démontré que les radicaux libres générés par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), en présence d'un ion ferreux (Fe²⁺) et d'un chélateur (EDTA), oxydaient la 2'-désoxyguanosine (dG) en 8-oxodG (Abu-Shakra & Zeiger, 1997).



dIz : 2-amino-5-[(2-désoxy-β-D-érythro-pentofuranosyl)amino]-4H-imidazol-4-one
 dZ : 2, 2-diamino-4-[(2-désoxy-β-D-érythro-pentofuranosyl)amino]-5(2H)-oxazolone
 dSp : dérivé spiroiminodihydantoine

Figure 13 : Schéma d'oxydation de la guanosine avec l'oxygène singulet, un électron et le radical [•]OH (Cadet, *et al.*, 2003).

II.A.5 Conséquences biologiques des dommages à l'ADN

Les réactions d'altération de l'ADN conduisent à la formation de plusieurs milliers de lésions par jour et par cellule. Les polymérases sont les premiers systèmes enzymatiques concernés par l'apparition d'une lésion dans le brin d'ADN. Tout d'abord leur progression peut être bloquée par certaines lésions et ainsi induire l'arrêt de la réaction de polymérisation. Par ailleurs, l'ARN polymérase est susceptible d'introduire une erreur, entraînant ainsi la formation d'un ARNm erroné ou incomplet. Ces erreurs, lors de la traduction, pourront alors induire la formation de protéines partiellement ou totalement modifiées. Une des conséquences les plus importantes est l'introduction d'une mutation dans le génome qui pourra être transmise au cours des divisions cellulaires pendant de nombreuses générations (Figure 15). Par ailleurs, il existe des lésions qui ont une action létale en bloquant la réaction de polymérisation à leur niveau (diols de thymidine).

Enfin certaines lésions conduisent à l'incorporation d'une base erronée. Cette nouvelle base peut être mutagène.

Le potentiel mutagène de la 8-oxodG est lié à ses propriétés d'induction d'erreurs dans le code génétique. En effet, il a été montré que la présence de 8-oxodG peut conduire à des mutations en induisant une mauvaise lecture de cette base (Kuchino, *et al.*, 1986) mais également des bases adjacentes (Kuchino, *et al.*, 1987). La formation de 8-oxodG, sans réparation adéquate, peut mener à une transversion de paire de bases de GC à TA (Akasaka & Yamamoto, 1994; Nagashima, *et al.*, 1995; Wallace, 2002). Cette transversion est fréquemment détectée dans le gène *p53* et dans le proto-oncogène *ras*. De plus, une corrélation directe entre la formation de 8-oxodG et la cancérogenèse a pu être rapportée dans plusieurs études (Feig, *et al.*, 1994; Griffiths, *et al.*, 2002). Cette modification de dG en 8-oxodG influence la stabilité d'un duplex d'ADN (Plum, *et al.*, 1995).

Les conséquences de l'induction de mutations sont variables. Dans de nombreux cas elles n'auront aucun effet sur la cellule et ses activités. Elles concernent notamment les mutations intervenant dans les parties non codantes de l'ADN, mais aussi les mutations muettes du fait de la dégénérescence du code génétique. Cependant, s'il arrive qu'une mutation survienne à une position codante dans la synthèse des protéines, trois conséquences majeures peuvent en découler :

- une évolution de certaines caractéristiques de la cellule (évolution d'une espèce),
- le vieillissement (Dodet, 1994),
- la cancérogenèse.

Cette dernière concerne un développement anarchique de cellules mutées. Cela conduit, après une longue période d'incubation et de plusieurs processus successifs (initiation, progression, promotion) au développement d'un cancer, considéré comme une maladie génétique progressive.

Le dosage de la 8-oxodG a déjà fait l'objet d'études sur un bivalve d'eau douce, *Unio tumidus* (Doyotte, 1998a). Au sein du LPTC, l'étude de sa formation et les techniques de dosage ont tout d'abord été abordées chez le rat, l'homme (Garcin, 1998 ; Tavan, 2001) et est maintenant utilisée en routine chez la moule (Akcha, 2000 ; Morin, *et al.*, 2003). Ces diverses études permettent d'avoir le recul nécessaire pour l'application de cette technique sur *C. fluminea*.

Le test du DNA unwinding (ou désassemblage de l'ADN) est quant à lui un test rapide pour quantifier la proportion entre les simples et doubles brins d'ADN, traduisant ainsi les activités de réparation de l'ADN et/ou les activités de synthèse des protéines.

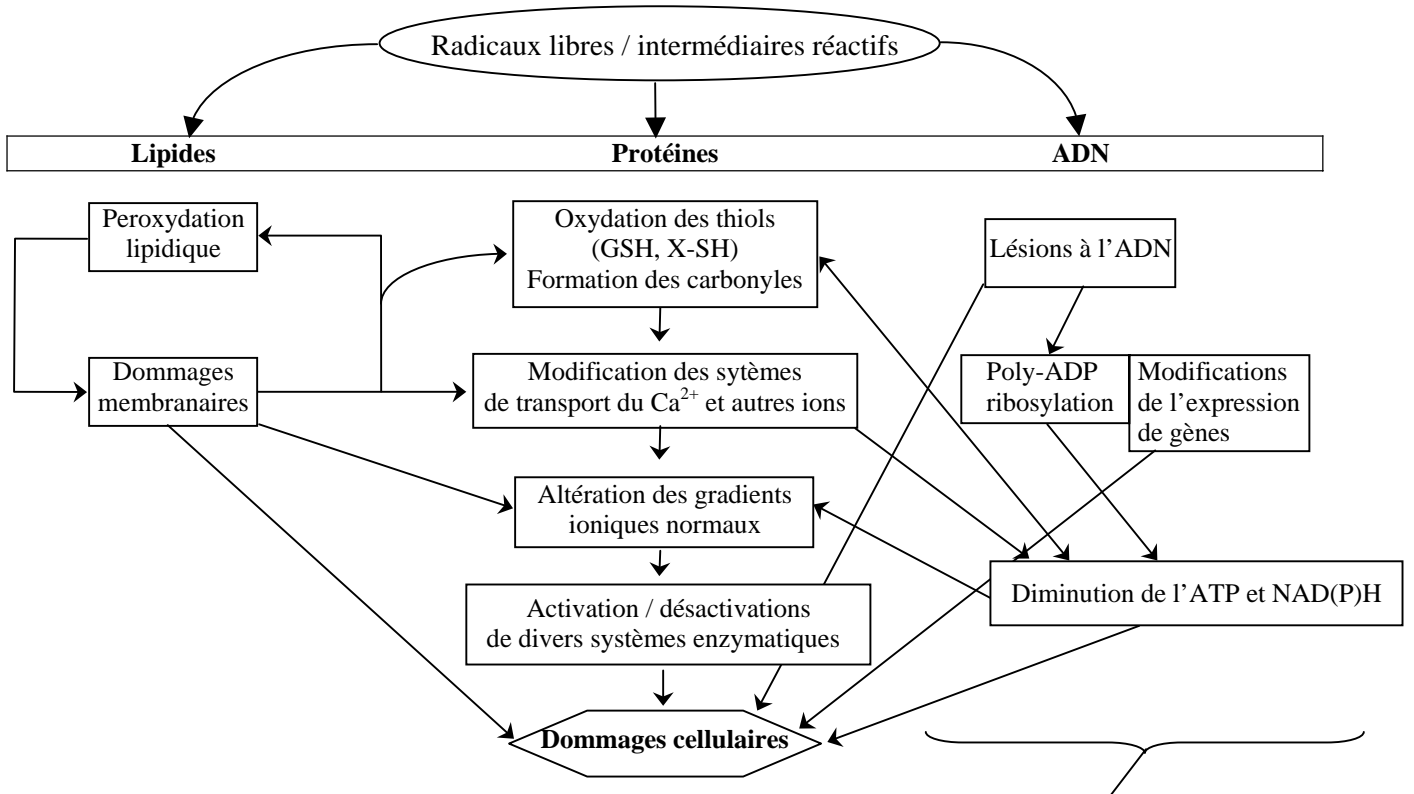


Figure 14 : Dommages cellulaires causés par les espèces réactives de l'oxygène (Kehrer, 1993)

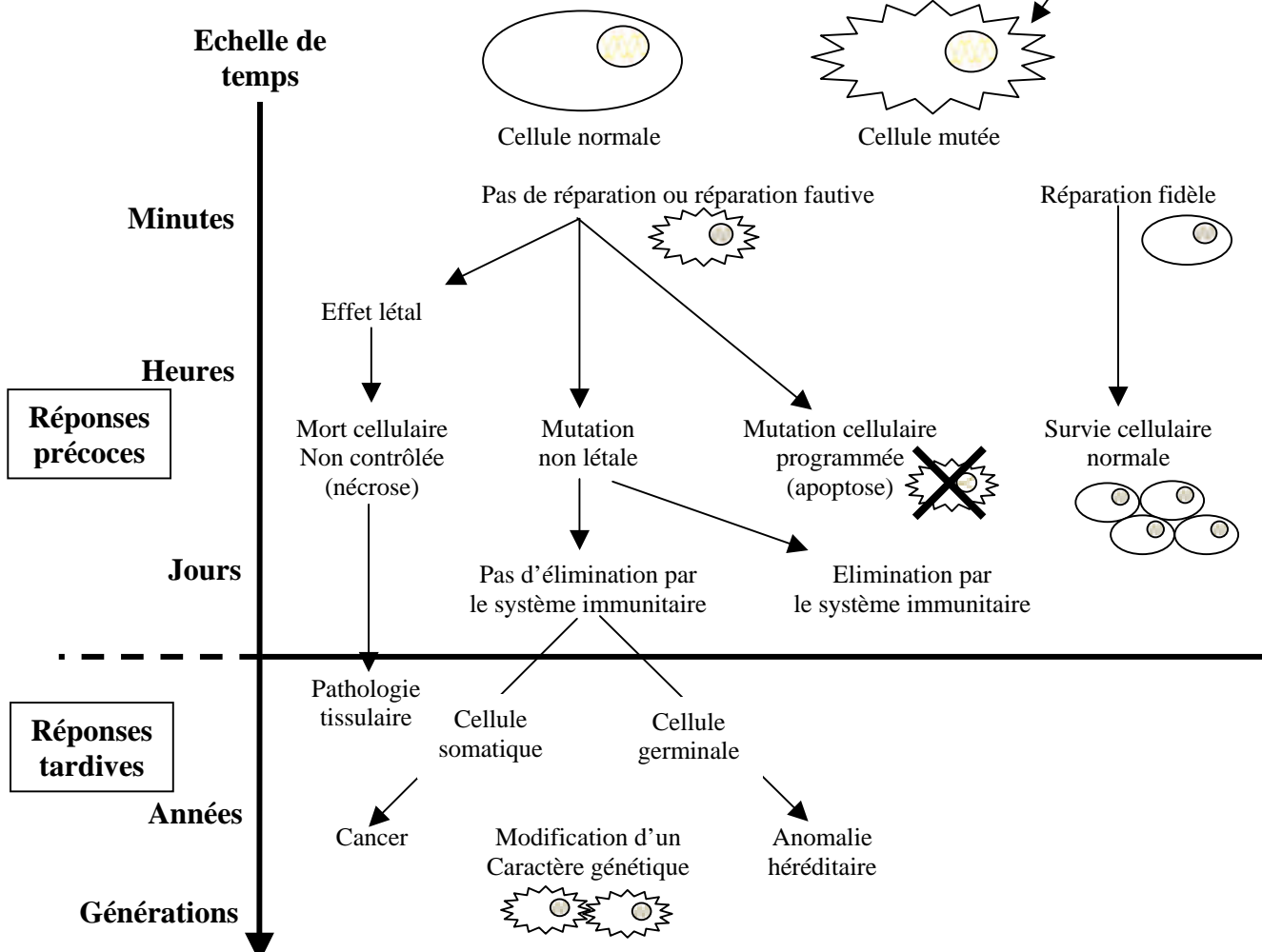


Figure 15 : Conséquences biologiques des dommages à l'ADN (Frelon, 2001)

II.B Immunotoxicité

L'immunotoxicité se réfère à la toxicité d'un composé sur le système immunitaire d'un organisme.

II.B.1 Le système immunitaire

Le système immunitaire est composé d'un ensemble de cellules (cellules tueuses, granulocytes, lymphocytes, mastocytes,...) que l'on trouve, soit circulant dans le sang ou la lymphe, soit dans les tissus lymphoïdes (moelle osseuse, rate, thymus et ganglions lymphatiques,...). Ce système, en perpétuel état de renouvellement et de maturation, sert à défendre l'organisme contre les invasions par des agents infectieux.

En comparaison avec les vertébrés, les progrès dans l'étude de l'immunité chez les invertébrés sont beaucoup plus lents à cause de la disparité des espèces et de la difficulté à corréler le système immunitaire et le phylum étudié.

Contrairement aux vertébrés qui possèdent un système circulatoire fermé, les mollusques possèdent un système circulatoire semi-ouvert, comprenant un cœur et des vaisseaux (Figure 16). Les hémocytes peuvent être retrouvés en différentes localisations, dans le compartiment circulatoire (vaisseaux et grands sinus des muscles), mais également dans les tissus.

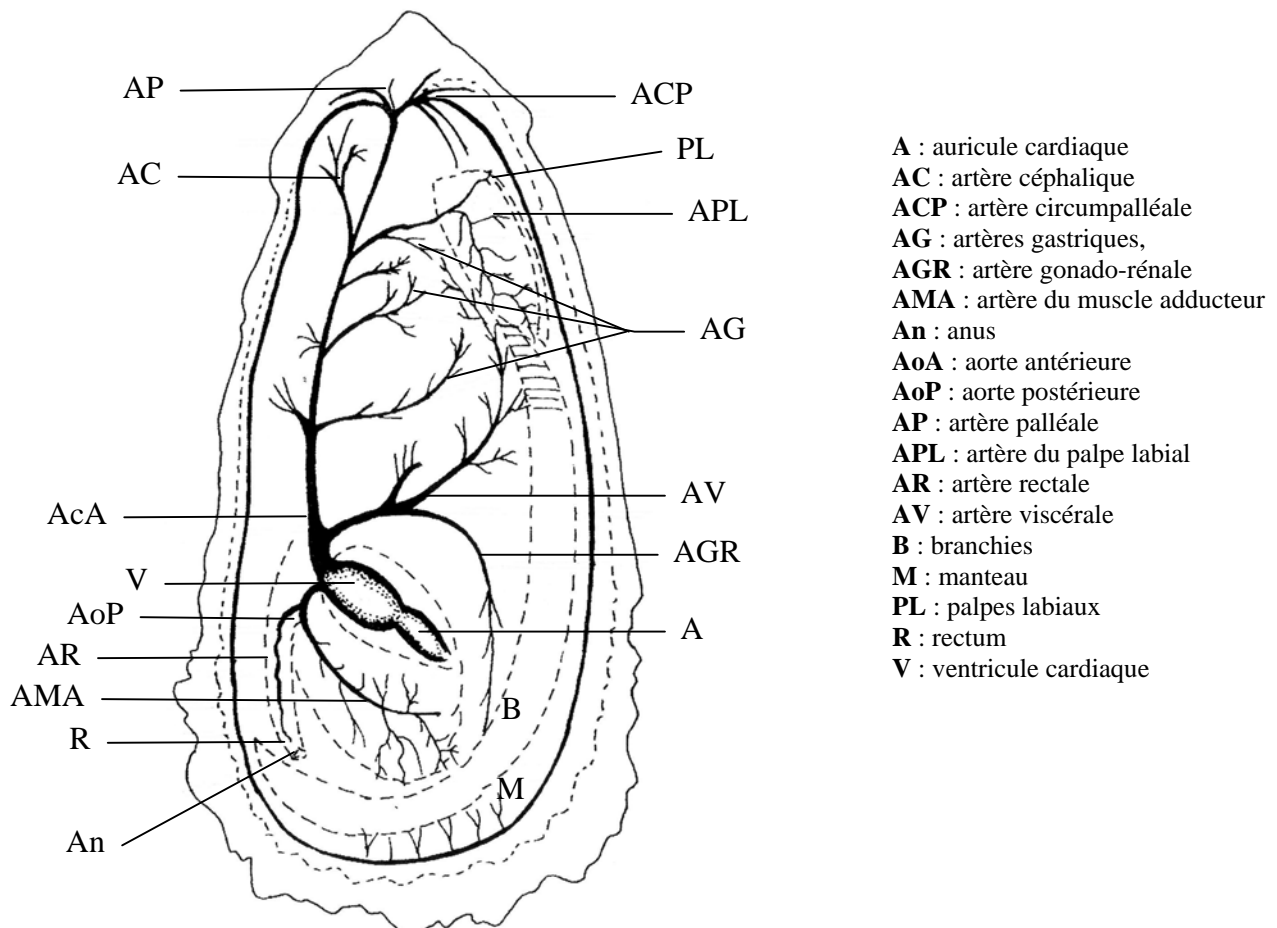


Figure 16 : Schéma du système artériel de *Crassostrea virginica* (Cheng, 1981).

Tous les invertébrés reconnaissent et sont capables de neutraliser les agents étrangers grâce à des systèmes de phagocytose et d'encapsulation ainsi que par la production de facteurs immunitaires humoraux (Chu, 1988). Ce qui différencie les réactions immunitaires des invertébrés des réponses des vertébrés réside dans l'absence de molécules spécialisées (les immunoglobulines). Les invertébrés n'arrivent jamais au niveau d'immunocompétence atteint par les vertébrés, pour lesquels les réponses cellulaires et humorales sont parfaitement intégrées. Les interactions qui régissent l'immunité chez les invertébrés n'ont pas la spécificité stricte que représentent les relations antigènes-anticorps chez les vertébrés. De plus, Les cellules immunitaires chez les invertébrés ne sont pas uniquement limitées à ce rôle.

II.B.1.1 Les types cellulaires

Chez les invertébrés, les cellules proviennent, comme chez les vertébrés, de cellules souches. Leur maturation fait apparaître deux types cellulaires : les hyalinocytes et les granulocytes (Balouet & Poder, 1979). Cependant, lors de cette étape, des colorations intermédiaires ont fait apparaître des types cellulaires morphologiques intermédiaires (Figure 17).

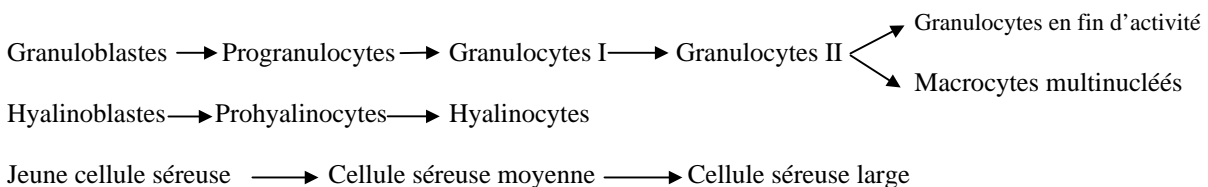


Figure 17 : Diagramme montrant une lignée hypothétique des hémocytes chez les bivalves (Cheng, 1981).

Ces types cellulaires, regroupés sous le terme d'hémocytes, jouent des rôles différents dans l'organisme.

II.B.2 Rôles des hémocytes

Les hémocytes de bivalves jouent plusieurs rôles au sein de l'organisme. Ce sont non seulement des cellules effectrices de la phagocytose pour la défense interne, mais les hémocytes interviennent aussi dans la cicatrisation des chairs, la réparation de la coquille, la digestion et le transport des nutriments que nous développerons ici. Il faut également y ajouter le transport de l'oxygène, les processus d'excrétion des déchets, le stockage des molécules énergétiques telles que le glycogène et les lipides.

II.B.2.1 Cicatrisation

Il est important de considérer le phénomène d'agrégation des hémocytes chez les bivalves. Les cellules établissent un contact entre elles grâce à leur filopodes. Ces interconnexions vont alors se raccourcir et s'épaissir et entraîner le regroupement des cellules. L'agrégation des hémocytes est intimement impliquée dans les processus de cicatrisation. Les agrégats d'hémocytes vont délimiter et boucher les blessures pour arrêter l'hémorragie.

Chez les huîtres, la phase initiale de la cicatrisation implique une infiltration de la zone blessée par un nombre important d'hémocytes.

Les hémocytes agrégés vont former un clou hémostatique pour délimiter la surface atteinte : la cicatrisation commence à l'intérieur de la lésion pour remonter à la surface avec un remplacement des cellules, qui sont fusiformes et différenciées par rapport aux hémocytes agrégés. Les hémocytes originaires du clou originel sont totipotents et peuvent se différencier en tissu épithélial pour remplacer la surface nécrosée de l'épithélium. Le collagène est ensuite déposé entre les cellules y compris celles du bouchon. Enfin, les hémocytes et le collagène sont remplacés par des cellules de Leydig.

Les hémocytes qui ont une activité de phagocytose peuvent s'infiltrer et phagocyter les débris de cellules nécrotiques.

II.B.2.2 Réparation de la coquille

La régénération de la coquille des mollusques implique :

- l'initiation d'une stimulation ou de stimuli résultant d'une blessure (ablation expérimentale d'une portion de la coquille),
- la mobilisation de calcium et d'autres substances depuis différentes régions de l'organisme,
- le transport du calcium et d'autres matériaux dans la zone de réparation,
- le dépôt localisé de la matrice organique et du carbonate de calcium.

Le rôle des hémocytes dans cette série d'événements est le transport de calcium et des protéines. Les bases chimiques et biochimiques de l'absorption, du transport du calcium et des protéines restent incertaines.

Les réponses immunologiques des hémocytes aux matériaux étrangers sont corrélées avec certains aspects du phénomène de calcification. En fait, une implantation hétérotypique (insertion d'un implant dans les tissus) est fréquemment réalisée chez les bivalves à des fins commerciales (formation des perles) ou scientifiques (études immunologiques et parasitologiques) (Tsujii, 1960; Bayne, *et al.*, 1979). Cependant, les réactions immunologiques peuvent être corrélées à l'induction d'érosion de concrétions calcaires dans le manteau avec des relargages de calcium et d'ions bicarbonates chez *Anodonta cygnea* (Zandee, *et al.*, 1980; Machado, *et al.*, 1988) à cause de l'acidose respiratoire et métabolique. A l'inverse, la situation d'alkalose est responsable de l'augmentation de telles concrétions (Machado, *et al.*, 1988). En fait, divers composants, tels que les protéines, les sucres, les glycosaminoglycanes et les lipides sont impliqués dans la minéralisation de la matrice organique pour former des concrétions calcaires depuis l'hémolymphe (formation des coquilles nacrées depuis le fluide extrapalléal des mollusques) (Moura, *et al.*, 2000).

II.B.2.3 Transport et digestion des nutriments

Le rôle des hémocytes dans le transport et la digestion des nutriments ne peut pas être considéré comme une fonction isolée. En fait, cette fonction est intimement associée à la défense interne.

Chez les bivalves, la digestion est à la fois extra- et intracellulaire. La digestion extracellulaire est effectuée dans l'estomac par des enzymes libérées lors de la dissolution du stylet cristallin. Mais on considère que la digestion intracellulaire est la plus importante. Ce type de digestion a lieu à l'intérieur de deux catégories de cellules : les hémocytes et les cellules digestives des diverticules digestifs. Du fait que les bivalves ont un système circulatoire ouvert (Figure 16), on peut trouver des hémocytes non seulement dans le cœur, les vaisseaux à hémolymphe et les sinus, mais aussi migrants à travers les tissus. Quelques-uns migrent dans le lumen du tractus alimentaire depuis la paroi de l'épithélium. Les nutriments solubles, dont quelques-uns déjà partiellement digérés par les enzymes provenant du stylet, vont être pinocytés alors que les particules alimentaires, un peu plus grosses, seront phagocytées. Une fois à l'intérieur de la cellule, la

digestion commence et les hémocytes vont se diriger vers les tissus les plus lointains et de cette manière transporter les nutriments dans les divers tissus (Yonge, 1926).

Le second site d'une digestion intracellulaire est le diverticule digestif (Figure 9B). Les produits finaux de la digestion à l'intérieur des cellules digestives du diverticule sont transférés aux hémocytes et au sérum, qui les transporteront aux différents tissus.

II.B.2.4 Défense interne

A ce jour, la plupart des recherches sur les hémocytes de bivalves ont été dirigées sur la compréhension de leur rôle dans la défense contre le non-soi.

II.B.2.4.a *Fraction cellulaire*

Les hémocytes des mollusques bivalves sont capables de phagocyter de nombreux micro-organismes et particules, dont des bactéries, levures, virus, globules rouges, protéines (albumine sérique de bovin, gammaglobuline) et d'encapsuler des corps étrangers de taille trop importante pour être phagocytés (Fischer, 1986).

La phagocytose et l'encapsulation font intervenir différentes propriétés des hémocytes dont les capacités de locomotion, d'agrégation, de transformation et d'adhésion.

La phagocytose a lieu pour les particules comprises entre 0,01 et 10 μ m. Les particules plus grosses sont encapsulées. Les plus petites, comme les lipoprotéines, les ferritines, les colloïdes ou les immunocomplexes, sont pinocytées (Robohm, 1984).

- **La phagocytose** est un type de mécanisme de défense interne aussi bien connu chez les invertébrés aussi bien que chez les vertébrés. Cela consiste en l'absorption de matériaux étrangers par certains types de cellules hôtes et de ce fait, empêche le contact direct de tels matériaux, biotiques ou abiotiques, avec les tissus de l'hôte.

La phagocytose est un processus de défense universel qui comprend : la reconnaissance du « non soi », l'activation du chimiotactisme, l'adhérence, l'internalisation et la destruction.

Les trois premières phases reposent sur des capacités de locomotion et de communication hémocyte-cible.

- *Reconnaissance et activation du chimiotactisme*

La phagocytose dans les cellules de mammifères commence par la liaison d'une particule à un récepteur qui déclenche une chaîne d'événements menant à la formation d'une coupe de phagocytose et par conséquent à l'internalisation de la particule. Des études morphologiques et génétiques chez *Dictyostelium* supportent l'existence de différents récepteurs interagissant avec les particules et révèlent que les protéines lysosomiales sont rapidement déversées dans le phagosome en maturation (Duffy & Vogel, 1984). Au moins deux systèmes de reconnaissance de surface cellulaire ont été proposés (Vogel, *et al.*, 1980). Un récepteur sert de médiateur pour lier des particules telles que les bactéries contenant des résidus glucose terminaux, alors que l'autre récepteur non-spécifique sert de médiateur pour lier des particules telles que les billes de latex pour des interactions plus hydrophobes.

- Adhérence

L'adsorption est une des étapes indispensables à la phagocytose. Chez les invertébrés, l'adhésion entre les cellules cibles et les cellules effectrices n'a fait l'objet que de très peu d'études. L'adhérence dépend de l'intégrité du cytosquelette de la cellule, formé d'un réseau tridimensionnel de filaments d'actine.

Le cytosquelette assure trois fonctions :

- une fonction structurelle, pour donner la forme et maintenir les organites et les membranes au sein de la cellule,
- une fonction de motricité, qui assure le déplacement coordonné et orienté des organites,
- une fonction de rails, orientant le transport des organites à l'intérieur même de la cellule.

L'incapacité des hémocytes anormaux à polymériser ou à dépolymériser les filaments d'actine peut être une des raisons à l'origine de leur perte d'adhérence ou d'ingestion des différentes cellules. Une autre possibilité résiderait dans l'expression manquante d'une protéine de 130 KDa, la p130. Cette protéine régulerait les protéines d'adhésion durant l'ontogenèse par contrôle des récepteurs cellulaires de surface associés à l'adhésion.

- Internalisation

Les particules étrangères sont internalisées dans un phagosome primaire, ce dernier fusionne avec des granules lysosomiaux (Figure 22 p.66), dont les enzymes ont été mises en évidence chez différentes espèces de bivalves (Tableau 5 p.68). La digestion des bactéries conduit à la formation de granules de glycogène probablement utilisés pour la nutrition des hémocytes ou de l'organisme par libération dans l'hémolymphe (Fischer, 1986).

- **L'encapsulation** survient lorsque l'hôte n'est pas capable d'isoler ou de réaliser la ségrégation du corps étranger (Feng, 1988). Les hémocytes ne sont pas préconditionnés ni à la phagocytose, ni à l'encapsulation, dans la mesure où les premiers hémocytes qui atteignent ce corps tentent de le phagocyter. En cas de corps étranger trop volumineux, les hémocytes s'étirent en cellules de type fibroblastique, formant une capsule. L'aspect de la capsule varie selon le parasite. Cependant, une coévolution du parasite et de l'hôte peut empêcher l'encapsulation (Fischer, 1986).

II.B.2.4.b Fraction humorale

Même si le système immunitaire des invertébrés présente des similitudes avec celui des vertébrés, il existe cependant des différences fondamentales (Fitzpatrick, *et al.*, 1989) : les invertébrés ne synthétisent pas d'immunoglobulines (Cheng, 1981) et ne possèdent pas de système du complément comme chez les vertébrés (Cheng, 1976), l'hémolymphe peut cependant véhiculer des facteurs humoraux. Chez *Lumbricus terrestris*, les cœlomocytes produisent des facteurs antibactériens, lytiques et agglutinants appelés antisomes. Les antisomes ont des propriétés analogues à celles des anticorps sécrétés par les lymphocytes B des mammifères (Fitzpatrick, *et al.*, 1989). Pour d'autres espèces comme la praire, *Mercenaria mercenaria*, la phagocytose va être stimulée par des lectines. L'hémolymphe peut avoir un effet opsonisant¹ (Yang & Yoshino, 1990) lorsque les particules à phagocyter sont peu nombreuses et que la température est basse (Tripp,

¹ Facilitation de la phagocytose

1992a; b). Que ce soient des lectines, des opsonines ou des agglutinines, ces molécules favorisent l'immuno-adhérence des particules à travers la membrane des hémocytes.

II.B.2.4.c Destruction enzymatique

Les granulocytes seraient la source primaire d'hydrolases bactéricides de l'hémolymphe (Anderson, 1993). Le lysozyme est une enzyme bactériolytique, retrouvée à la fois dans le sérum et dans les hémocytes. Les autres enzymes lysosomiales (Tableau 5 p.68) sont également présentes dans le sérum et les hémocytes, sauf l'amylase qui n'a pas été trouvée chez ces derniers. Des substances antimicrobiennes, des hémolysines, ont également été mises en évidence dans des extraits tissulaires d'huître ainsi que chez la praire et la moule (Chu, 1988).

L'exposition à des bactéries *in vitro* ou *in vivo* a démontré une synthèse accrue d'enzymes lysosomiales à l'intérieur de la cellule et leur libération secondaire dans le sérum. Ces molécules pourraient jouer un rôle dans la résistance acquise. L'immunité acquise est caractérisée par sa spécificité, sa nature adaptative et son irréversibilité.

Des niveaux aussi élevés d'enzymes lymphatiques pourraient aussi être interprétés comme des manifestations pathologiques plutôt que comme des réponses de défense. En effet, l'exposition des mollusques bivalves à des bactéries n'a pas toujours provoqué une augmentation des enzymes lysosomiales (Chu, 1988).

Le métabolisme oxydatif constitue le second mécanisme antimicrobien mis en évidence dans le processus de phagocytose. En présence d'un élément pathogène, ces cellules produisent une série de réactions qui vont libérer des espèces réactives de l'azote (Tafalla, *et al.*, 2003) et de l'oxygène (Gómez-Mendikute, *et al.*, 2002).

Lors d'une stimulation membranaire, il y a une augmentation de la consommation d'oxygène (flambée respiratoire) (Figure 18). L'oxygène va être réduit en anion superoxyde par l'activité de la NADPH-oxydase membranaire. Il en résulte une production de métabolites actifs de l'oxygène tels que le radical hydroxyle, l'oxygène singulet et le peroxyde d'hydrogène qui sont hautement anti-microbiens par eux-mêmes ou en coopération avec des enzymes. Ces composés réagissent avec les particules internalisées dans les phagosomes.

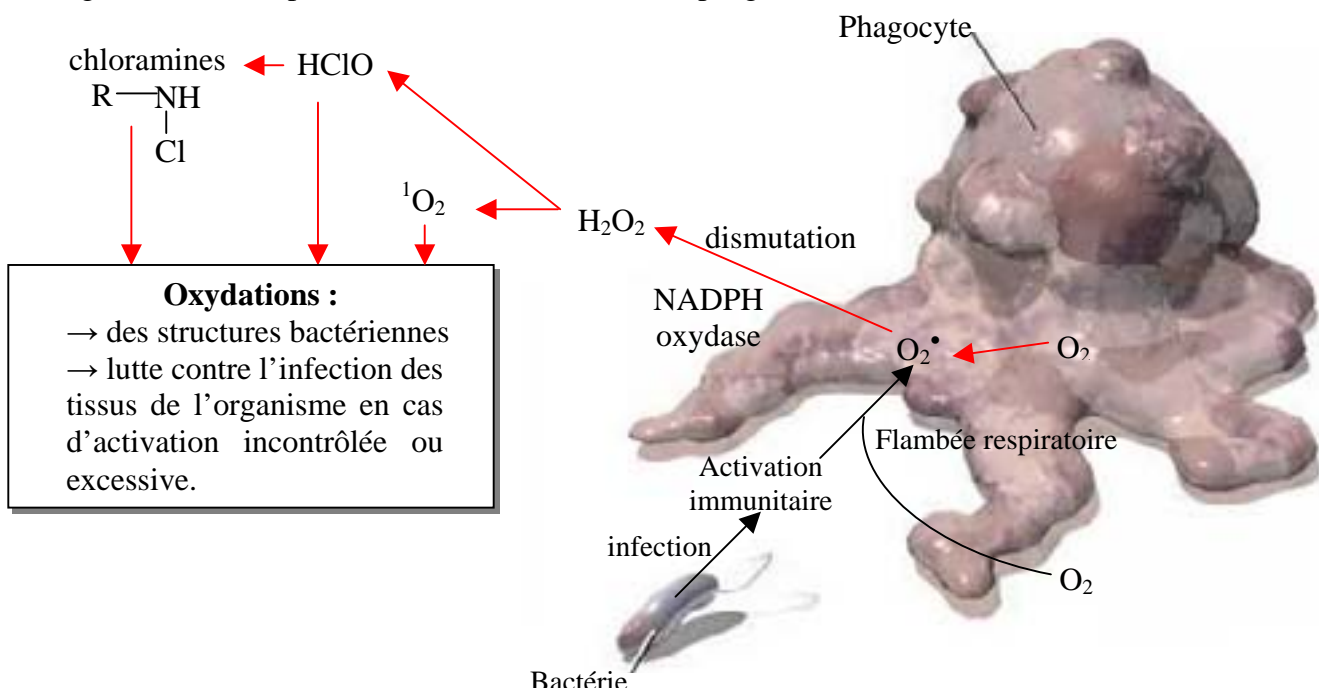


Figure 18 : Production de radicaux au cours de la lutte contre une infection (Deby, 1991)

II.B.2.5 Produits immunotoxiques et leurs effets

Le système immunitaire est très complexe et encore imparfaitement connu. Il est très sensible et les perturbations peuvent provenir de différentes sources comme le dérèglement nutritionnel (Gibson, *et al.*, 2000), un stress (Shao, *et al.*, 2003) ou l'effet immunotoxique de certaines molécules (Figure 19 ; Tableau 3). Les effets immunotoxiques prennent en compte l'immunotoxicité directe, l'hypersensibilité et l'auto-immunité.

L'immunotoxicologie se définit comme l'étude des effets adverses dus à l'interaction entre les xénobiotiques et le système immunitaire (Kimber & Dearman, 2002). Lors des processus immunitaires, la machinerie cellulaire met en place une cascade d'événements où différents composés tel le calcium voient leur concentration modulée. Les contaminants peuvent avoir des effets sur ces événements et modifier la réponse immunitaire (Figure 19).

Les effets immunotoxiques sont répartis en trois classes : l'**immunosuppression** (perturbation ou dommage à un ou plusieurs composants du système immunitaire entraînant une fonction immunitaire affaiblie et une résistance de l'hôte réduite), l'**immunodépression** et l'**immunostimulation**. Les effets immunotoxiques de différents composés sont reportés dans le Tableau 3.

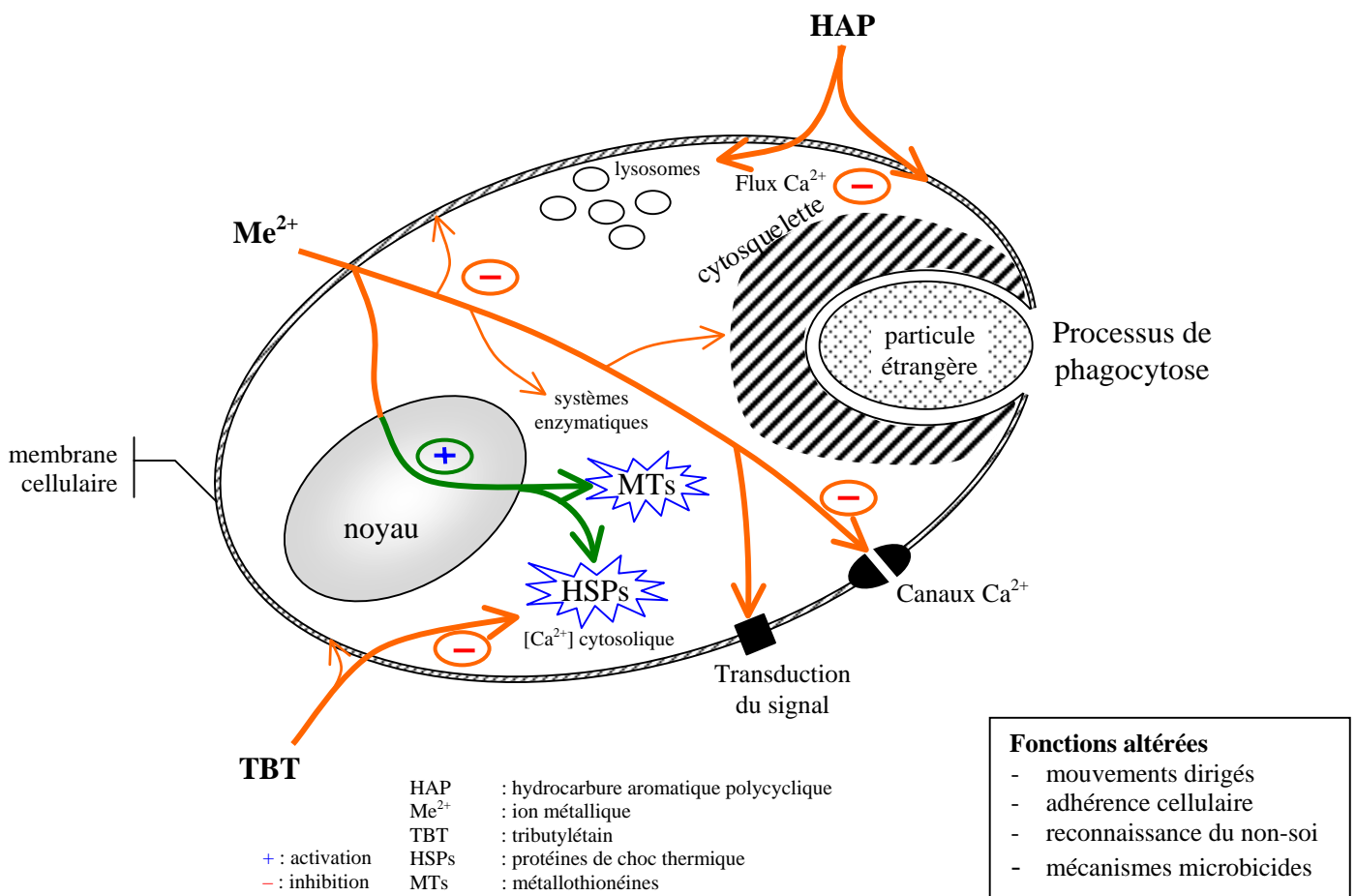


Figure 19 : Toxicité induite par des xénobiotiques dans les hémocytes
(Source : M.Auffret – LEMAR – Université de Brets)

Le dosage de l'effet immun est actuellement considéré comme un indicateur sensible d'une grande variété de fonctions physiologiques. Il est quantifiable rapidement par de multiples techniques (Vos, *et al.*, 1982 ; Cajaraville & Pal, 1995; Burchiel, *et al.*, 1997; Blaise, *et al.*, 2002b). Ceci a entraîné le développement de l'immunotoxicologie, considérée comme l'un des principaux centres d'intérêts d'une étude toxicologique.

Beaucoup de produits issus des activités agricoles ou industrielles sont introduits dans l'environnement. Ces produits provoquent, *via* les mécanismes d'immunotoxicité, des complications chez les populations exposées.

II.B.2.5.a Les métaux

La toxicité des métaux sur les mollusques apparaît fortement influencée par des variations de facteurs physico-chimiques du milieu comme la température et la salinité (McLusky, *et al.*, 1986). Elle serait plus marquée lorsque ces conditions approchent des limites supportées par ces organismes. Ainsi, même si les causes sont peu connues et impliqueraient des perturbations d'ordre physiologique (osmorégulation, métabolisme cellulaire), les études de toxicité aiguë doivent prendre ces paramètres environnementaux en considération. Les métaux n'ont pas tous le même impact sur la santé des mollusques bivalves : certains (cuivre, zinc) sont essentiels à faible dose et nocifs à forte dose, et d'autres nocifs même à faible dose (arsenic) (van der Velde, *et al.*, 1992). Leur toxicité dépend également de la concentration du métal, de sa toxicité intrinsèque, de la capacité d'adhérence, de la spécificité du système biologique au transport du métal et de la biotransformation du métal en formes dérivées parfois plus toxiques (Zatta, *et al.*, 1992). Le cadmium par exemple est un métal lourd avec des effets particuliers. En effet, à faible dose, celui-ci induit une stimulation immunitaire, alors qu'à de plus fortes doses, il aurait un effet inhibiteur (Sauvé, *et al.*, 2002). Cet effet de stimulation à faible dose est un effet hormétique.

II.B.2.5.b Les composés organiques

Chez *Mytilus edulis*, les hydrocarbures aromatiques polycycliques inhibent la phagocytose et provoquent des dommages aux lysosomes (Grundy, *et al.*, 1996b), ceci peut être expliqué par des perturbations dans la perméabilité membranaire (Grundy, *et al.*, 1996a). Mais il semblerait qu'il y ait en fait une augmentation du nombre des hyalinocytes (petits hémocytes) et une diminution du nombre des granulocytes (gros hémocytes) (Coles, *et al.*, 1994) par un effet de lyse.

Il semble que les hydrocarbures tels que le B(a)P ait un effet perturbateur sur les filaments d'actine des hémocytes des bivalves (Gómez-Mendikute & Cajaraville, 2003) : le métabolisme du B(a)P augmente la production de l'anion superoxyde.

II.B.2.5.c Les dérivés de synthèse

Pour les pesticides, il est à souligner que le taux de pesticides en dessous duquel on ne voit pas d'effet dépend de l'espèce. On assiste à une immunosuppression chez les rats (Vos & Krajnc, 1983; Rodgers, 1995) et chez certains mollusques (Galloway & Depledge, 2001). Il est montré que les pesticides ont une influence sur l'immunité humorale et très peu d'effet sur l'immunité à médiation cellulaire. Des dysfonctionnements dus aux pesticides sont le plus souvent liés à la dose et à la durée de l'exposition (Banerjee, *et al.*, 1996). L'effet des pesticides a été peu étudié chez les mollusques bivalves. Ces organismes présentent cependant une très faible réactivité à l'exposition

aux organophosphorés et carbamates, contrairement aux poissons et crustacés, ce qui ferait des mollusques bivalves de médiocres indicateurs pour ce type de polluant.

Un autre composant pose à l'heure actuelle des problèmes : le tributyl-étain contenu dans les peintures anti-salissures des bateaux. Son effet est particulièrement net dans les zones portuaires. Des expositions d'huîtres (*Crassostrea gigas*) à ce composé a produit une diminution de l'activité cytotoxique et une diminution du taux de locomotion des hémocytes, affectant ainsi la phagocytose. Des études de toxicité chronique à court terme sembleraient indiquer le haut degré de sensibilité des hémocytes (Fisher, *et al.*, 1990). De plus ce composé est connu pour avoir des effets sur la régulation endocrinienne ; il pourrait donc avoir une influence sur la phagocytose non seulement de façon directe (mécanismes de phagocytose) mais aussi indirect (perturbation des cascades endocriniennes pour la formation d'hémocytes).

La réponse immunitaire est dépendante des liaisons aux différents récepteurs ce qui rend le système vulnérable aux interférences dues aux produits toxiques. Ils peuvent induire des réponses inappropriées. De plus, tout produit interférant avec le métabolisme énergétique cellulaire et la production d'ATP va réduire en conséquence la viabilité des cellules immunitaires (Buttgereit, *et al.*, 2000).

Ce biomarqueur d'effets a largement été développé chez les bivalves marins et très peu chez les bivalves d'eau douce (Tableau 3). Le développement et l'application de ce biomarqueur chez *C. fluminea* nous permettra d'évaluer son potentiel de défense et de réparation face aux agressions extérieures.

Organisme	Type cellulaire	Polluant	Type d'exposition	Temps d'exposition	Variations	Référence
<i>Mytilus edulis</i>	hémocytes	phénanthrène	L	7 - 14 jours	↘ - →	(Wootton, <i>et al.</i> , 2003)
<i>Mytilus edulis</i>	hémocytes	AgNO ₃	I	18h	↘	(Sauvé, <i>et al.</i> , 2002)
		HgCl ₂	I	18h	↘	
		CH ₃ HgCl	I	18h	↘	
		ZnCl ₂	I	18h	↗	
		CdCl ₂	I	18h	↘	
<i>Mytilus edulis</i>	hémocytes	CuSO ₄	L	7 jours	↗	(Pipe, <i>et al.</i> , 1999)
<i>Mytilus edulis</i>		HAP		8 sem.	↘	(Lorteau, <i>et al.</i> , 1995)
<i>Mytilus edulis</i>	hémocytes	Mélange HAP	L	2 - 4 sem	↘	(Grundy, <i>et al.</i> , 1996b)
<i>Mytilus edulis</i>	hémocytes	MBT	I	18h	↘	(Bouchard, <i>et al.</i> , 1999)
		DBT	I	18h	↗↘	
		TBT	I	18h	↘	
<i>M. galloprovincialis</i>	hémocytes	HAP	M		↘	(Pipe, <i>et al.</i> , 1995)
		métaux			↘	(Olabarrieta, <i>et al.</i> , 2001)
<i>M. galloprovincialis</i>	hémocytes	CdCl ₂	I	24h	↗	
<i>LLC-PK1</i>	cellules rénales	CdCl ₂	I	24h	↗	
<i>Ostrea edulis</i>	hémocytes	CdCl ₂	L	7 jours	↘	(Auffret, <i>et al.</i> , 2002)
		CdCl ₂ + CuCl ₂	L	7 jours	↘	(Lorteau, <i>et al.</i> , 1995)
<i>Crassostrea virginica</i>	hémocytes	Hg			↗ ↘	

Organisme	Type cellulaire	Polluant	Type d'exposition	Temps d'exposition	Variations	Référence			
<i>Crassostrea virginica</i>	hémocytes	Mn	I - L		→	(Anderson, <i>et al.</i> , 1992)			
		Pb			→				
		Cd			→				
		Zn			→				
		Co			↗				
		Cr			↗				
		Cu			↗				
		Fe			↗				
		Sn			↗				
		TBT	I	1h - 20h	↘ - ↘	(Anderson, <i>et al.</i> , 1997)			
<i>Lumbricus terrestris</i>	coelomocytes	HgCl ₂	I	18h	↘	(Fugere, <i>et al.</i> , 1996)			
		CH ₃ HgCl ₂	I	18h	↘				
		CdCl ₂	I	18h	↘				
		ZnCl ₂	I	18h	↘				
		PbCl ₂	I	18h	→				
		(CH ₃ COO) ₄ Pb	I	18h	→				
<i>Eisenia fetida andrei</i>	coelomocytes	Carbaryl	L	15 jours	↘	(Ville, <i>et al.</i> , 1997)			
		2,4D	L	15 jours	↘				
<i>Cyrtodaria siliqua</i>	hémocytes	AgNO ₃	I	18h	↘	(Sauvé, <i>et al.</i> , 2002)			
		HgCl ₂	I	18h	↘				
		CH ₃ HgCl	I	18h	↘				
<i>Mactometris polynyma</i>	hémocytes	AgNO ₃	I	18h	↘	(Sauvé, <i>et al.</i> , 2002)			
		HgCl ₂	I	18h	↘				
		CH ₃ HgCl	I	18h	↘				
		ZnCl ₂	I	18h	→				
		CdCl ₂	I	18h	↘				
		MBT	I	18h	↘				
		DBT	I	18h	↘				
		TBT	I	18h	↘				
		<i>Mya arenaria</i>	hémocytes	AgNO ₃	I		18h	↘	(Sauvé, <i>et al.</i> , 2002)
				HgCl ₂	I		18h	↘	
CH ₃ HgCl	I			18h	↘				
ZnCl ₂	I			18h	→				
CdCl ₂	I			18h	↘				
MBT	I			18h	→				
DBT	I			18h	↘				
TBT	I			18h	↘				
<i>Elliptio complanata</i>	hémocytes	AgNO ₃	I	18h	↗ ↘	(Sauvé, <i>et al.</i> , 2002)			
		HgCl ₂	I	18h	↘				
		CH ₃ HgCl	I	18h	↗ ↘				
		ZnCl ₂	I	18h	↗ ↘				
		CdCl ₂	I	18h	↗ ↘				

Organisme	Type cellulaire	Polluant	Type d'exposition	Temps d'exposition	Variations	Référence
<i>Dreissena polymorpha</i>	hémocytes	HgCl ₂	I	18h	↘	(Sauvé, <i>et al.</i> , 2002)
		CH ₃ HgCl	I	18h	↘	
		CdCl ₂	I	18h	↘	
<i>Mya truncata</i>	hémocytes	HgCl ₂	I	18h	↘	(Sauvé, <i>et al.</i> , 2002)
		CH ₃ HgCl	I	18h	↘	
<i>Serripes groenlandicus</i>	hémocytes	HgCl ₂	I	18h	↘	
<i>Mya arenaria</i>	hémocytes	PCB (Sédiments)	L	4 - 10 sem	→ - ↘	(Fournier, <i>et al.</i> , 2002)
<i>Mactrometris polynyma</i>	hémocytes	PCB (Sédiments)	L	4 - 12 sem	↘ - ↘	
<i>Cerastoderma edule</i>	hémocytes	phénanthrène	L	7 - 14 jours	→ - ↘	
<i>Ensis siliqua</i>		phénanthrène	L	7 jours	→	
<i>Tapes philippinarum</i>		CuCl ₂	L	7 jours	↘	(Matozzo, <i>et al.</i> , 2001)
		CdCl ₂	L	7 jours	→	
<i>Mercenaria mercenaria</i>	hémocytes	PCB	L	1 - 18 sem	↘	(Anderson, <i>et al.</i> , 1981)
		HCB	L	1 - 18 sem	↘	
		BaP	L	1 - 18 sem	↘	
<i>Ciona intestinalis</i>	hémocytes	TBT	I	90 min	↘	(Cooper, <i>et al.</i> , 1995)
		TPT	I	90 min	→	
<i>Ciona intestinalis</i>		DBT	I	90 min	↘	
		DPT	I	90 min	→	
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	macrophages	HgCl	L	5 sem	↘	(Sanchez-Dardon, <i>et al.</i> , 1999)
		CdCl	L	5 sem	↘	
		ZnCl	L	5 sem	↘	
		CdCl/ZnCl	L	5 sem	↘	
		HgCl/ZnCl	L	5 sem	↘	
		CdCl/HgCl/ZnCl	L	5 sem	↘	

Tableau 3 : Modulation de l'activité des cellules phagocytaires

 Expositions *in vitro* (I), en laboratoire (L), en milieu naturel (M) (polluant majoritaire détecté).

↗ augmentation, ↘ diminution de l'activité de phagocytose, → pas de changement.

PCB : polychlorobiphényles

BaP : benzo(a)pyrène

DBT : dibutylétain

MBT : monophénylétain

TPT : triphénylétain

HCB : hexachlorobenzène

MBT : monobutylétain

TBT : tributylétain

DPT : diphénylétain

2,4D : acide 2,4 dichlorophénoxyacétique

II.C Reprotoxicité

II.C.1 Le système endocrinien chez les bivalves

Le système endocrinien se compose d'un ensemble de glandes qui agissent sur l'individu en fonction de son environnement. Nous verrons ici le cas des neurotransmetteurs ainsi que celui des hormones, et plus particulièrement le cas des hormones stéroïdiennes.

II.C.1.1 Les neurotransmetteurs

Le système endocrinien des mollusques est principalement centré sur des ganglions neurosécréteurs du système nerveux central : les ganglions cérébraux, pleuraux et pédieux identifiés en particulier chez *Mytilus edulis* (Motavkine & Varaksine, 1989). Ils renferment tous des cellules neurosécrétrices (CNS), bien que le ganglion cérébroïde soit celui qui en contient le plus grand nombre (Lubet, *et al.*, 1987). Trois types de CNS ont été répertoriés et une corrélation significative a pu être démontrée entre leur nombre et le cycle de reproduction chez la moule (Lubet, *et al.*, 1986; Lubet, *et al.*, 1987).

Le produit de ces sites neurosécréteurs sont des neuropeptides. Leur présence et leurs concentrations varient selon le type de ganglions ou le tissu considéré et la saison.

Le rôle des neurosécrétions au cours de la maturation sexuelle a pu être mis en évidence grâce à des expérimentations faisant appel à des cultures organotypiques qui consistent en la mise en culture de tissu de gonade en présence ou non de ganglion(s) (Houtteville & Lubet, 1974; Mathieu & Lubet, 1980; Lubet, *et al.*, 1986) et à l'observation des variations des concentrations de ces neurosécrétions durant la gamétogenèse (Stefano & Catapane, 1977; Osada & Nomura, 1989a; Pani & Croll, 2000). Ces différentes études ont montré que les neurotransmetteurs assurent deux fonctions régulatrices principales durant la maturation sexuelle : la régulation de la multiplication des gamètes d'une part et la régulation de la mobilisation des réserves énergétiques pour le développement des gamètes, d'autre part. Ce dernier point concerne d'ailleurs tout particulièrement la vitellogenèse chez les femelles pour le développement des ovocytes (Lubet & Mathieu, 1982).

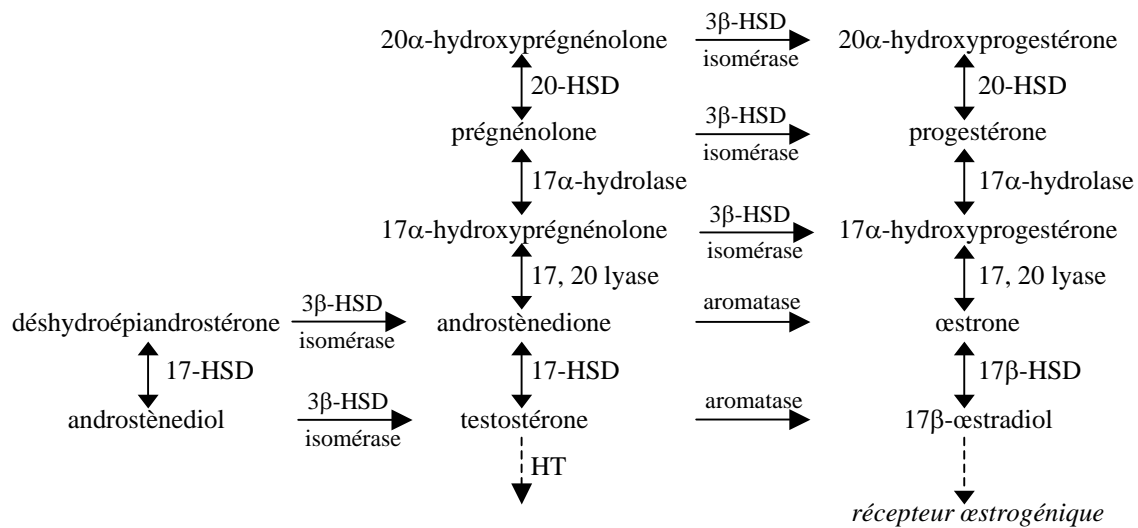
Tout comme pour la multiplication des ovogonies, la présence des ganglions cérébroïdes est indispensable à la vitellogenèse et à la croissance ovocytaire chez *Mytilus edulis* (Lubet, *et al.*, 1986), *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis*, *Ruditapes philippinarum*, *Pecten maximus*, *Chlamys opercularis* et *Chlamys varia* (Lubet, *et al.*, 1987).

L'ablation des ganglions cérébroïdes réalisée chez *Modiolus demissus* (moule côtelée) dans les années soixante a clairement montré que la disparition des neurosécrétions de ces ganglions accélérerait l'apparition de la ponte (Nagabushanam, 1964).

II.C.1.2 Les hormones stéroïdiennes

Les hormones sont des médiateurs chimiques très actifs sur l'activité d'organes dits cibles qui sont essentiels à la régulation fine des fonctions physiologiques majeures des organismes vivants. Ainsi le nombre d'hormones et leurs rôles sont très variés et souvent complexes avec des effets en cascade et des mécanismes de feed-back. Les régulations hormonales se rencontrent dans les mécanismes de maintien de l'homéostasie mais aussi dans la physiologie de la reproduction. L'action hormonale est par nature intégrative, car elle est étroitement liée aux organes sensoriels, à certaines parties du système nerveux (complexe hypothalamo-hypophysaire chez les vertébrés), et à certains organes cibles (gonades, foie, reins,...).

Les connaissances des hormones stéroïdiennes chez les bivalves sont encore fragmentaires, la Figure 20 résume les activités enzymatiques impliquées dans la stéroïdogénèse.



HSD: hydroxystéroïde déshydrogénase; HT: testostérone hydrolase

Figure 20 : Synthèse des représentations des composantes enzymatiques et hormonales de la stéroïdogénèse rencontrées chez les bivalves (Gauthier-Clerc, 2003).

La présence du 17β -œstradiol (E2), de la testostérone (T), de la progesterone (P), de l'androstènedione (A), de l'œstrone (E1) et de l'œstriol (E3) a été rapportée chez les bivalves. Ces stéroïdes ont été quantifiés dans la biomasse totale mais aussi dans la gonade, le manteau, les fluides corporels, le pied et les branchies (Reis-Henriques, *et al.*, 1990; Matsumoto, *et al.*, 1997; Morcillo & Porte, 2000; Siah, *et al.*, 2003; Aarab, *et al.*, 2004b ; Aarab, *et al.*, 2005). Chez *C. fluminea*, l'incubation de fractions microsomales avec de la testostérone a permis de démontrer la capacité de l'animal à métaboliser cette hormone grâce à une réaction enzymatique NADPH-dépendante. Les métabolites sont alors représentés majoritairement par la 6β -hydroxytestostérone (55%), puis l'androstènedione et la 2β -hydroxytestostérone (Aarab, *et al.*, 2005).

Les concentrations de la gonade en stéroïdes présentent des variations selon le sexe et l'état de maturation sexuelle des bivalves (Stefano & Catapane, 1977; Osada & Nomura, 1989a). Les concentrations en testostérone dans la gonade augmentent chez les mâles comme chez les femelles *Mytilus edulis* durant la maturation sexuelle, mais la concentration est presque dix fois plus importante chez les mâles (43 ng.g^{-1} poids frais) que chez les femelles ($5,4 \text{ ng.g}^{-1}$) à un stade avancé de la maturation sexuelle alors que les concentrations en 17β -œstradiol sont comparables pour les deux sexes avec des valeurs proches de $4,5 \text{ ng.g}^{-1}$ (De Longcamp, *et al.*, 1974). La concentration en 17β -œstradiol est au contraire près de trois fois plus importante dans les gonades femelles de *Crassostrea gigas* que chez les mâles : environ $1,4$ contre $0,35 \text{ ng.g}^{-1}$ durant la gamétogenèse et $0,7$ contre $0,3 \text{ ng.g}^{-1}$ après la ponte (Matsumoto *et al.*, 1997). La variation saisonnière des concentrations en stéroïdes dans l'animal entier ou dans la gonade est synchronisée avec la maturation sexuelle (Matsumoto, *et al.*, 1997; Siah, *et al.*, 2002).

Des expérimentations *in vitro* et *in vivo* ont permis d'observer l'implication des stéroïdes dans divers processus physiologiques des bivalves. Les effets du 17β -œstradiol chez *Crassostrea gigas* (Mori, 1968a; 1980) sont liés d'une part à la maturation sexuelle et d'autre part à la différenciation sexuelle des individus. Le 17β -œstradiol permet un accroissement du taux de fécondation grâce à une intensification de la mobilité des spermatozoïdes et une accélération du taux de développement des œufs (Mori, 1968a; b). La croissance de la gonade femelle s'avère également accélérée en présence

de 17β -œstradiol (Mori, *et al.*, 1969) alors qu'aucun effet n'a été observé au niveau des reins ou dans les diverticules de la glande digestive (Mori, 1980). Ces dernières observations révèlent donc une spécificité d'action de 17β -œstradiol vis-à-vis de la gonade. D'autre part, une réversibilité du sexe a été observée chez les mâles exposés au 17β -œstradiol (Mori, 1969) durant les premiers stades de la maturation sexuelle. Cela démontre l'importance des stéroïdes dans le processus de différenciation sexuelle, de même que la variation de la susceptibilité des tissus pour les stéroïdes durant leur différenciation.

Il existe de rares études qui se sont intéressées au lien entre l'action des neurotransmetteurs et celle des hormones stéroïdiennes. Une injection de propionate de 17β -œstradiol favoriserait l'activation des neurosécrétions chez *Anodonta cygnea* (Baranyi, 1973). Il a été également proposé une fonction régulatrice du 17β -œstradiol vis-à-vis des catécholamines après avoir observé que son administration *in vivo* dans la gonade de *Pectinopecten yessiensis* (Osada & Nomura, 1989b) entraînait une diminution des concentrations en noradrénaline et en dopamine. Un certain rétrocontrôle entre stéroïdes et neurotransmetteurs dans la gonade pourrait être déterminant durant la ponte puisqu'une baisse des concentrations en catécholamines est systématiquement observée durant cette période de la reproduction. Il ne faut cependant pas exclure d'autres rétrocontrôles impliquant d'autres hormones pour décrire le contrôle endocrinien du déclenchement de la ponte. Une schématisation de ces relations est représentée dans la Figure 21.

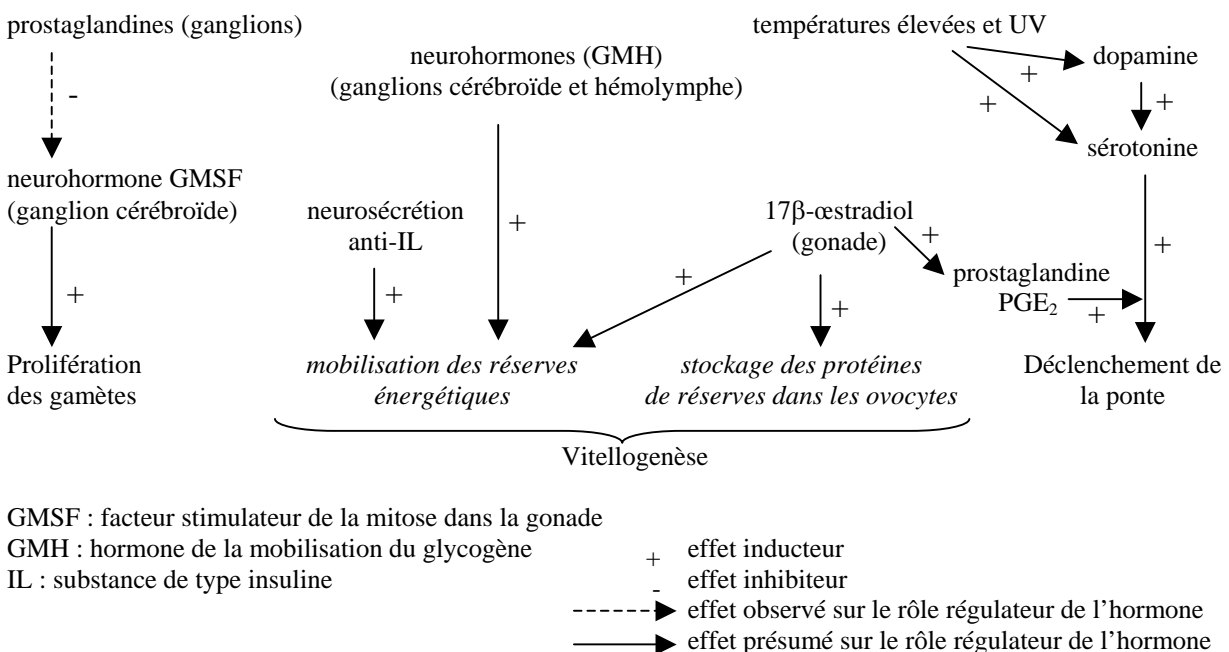


Figure 21 : Schématisation de l'action d'hormones des bivalves au cours de la reproduction (Gauthier-Clerc, 2003).

II.C.1.3 La vitellogénèse chez les bivalves

La vitellogénèse représente le processus de stockage de réserves, au sein de l'ovocyte, pour le développement du futur embryon. Chez les bivalves, les informations sont beaucoup moins nombreuses quant à la caractérisation de vitellines et/ou de précurseurs.

Bien qu'il n'existe que très peu d'informations sur le système endocrinien des invertébrés, la synthèse de la vitelline (Vn), protéine majeure trouvée dans les ovocytes d'invertébrés synthétisée depuis la vitellogénine, a été montrée comme étant régulée par les œstrogènes chez les bivalves d'eau douce et marins (Quinn, *et al.*, 2004). Cependant, après injection *in vivo* de 17 β -œstradiol, les concentrations en vitelline et le diamètre des ovocytes ont augmenté dans la gonade de l'huître. Ces deux constats montrent clairement un effet inducteur du 17 β -œstradiol sur la vitellogenèse. L'augmentation dans la gonade de *Crassostrea gigas* et *Patinopecten yessoensis* des concentrations en 17 β -œstradiol durant la croissance des ovocytes (Matsumoto, *et al.*, 1997) renforce l'hypothèse d'un rôle clef du 17 β -œstradiol au cours de la vitellogenèse.

II.C.2 Les perturbateurs endocriniens

Certains polluants environnementaux (Tableau 5) sont capables d'altérer l'équilibre du système endocrinien chez les animaux et chez l'Homme ainsi que le développement et la fonctionnalité de différents systèmes, et ce, de manière parfois irréversible. En particulier, le système reproducteur a été identifié comme une cible particulièrement exposée.

<i>Herbicides</i>
Diquat dibromure, Atrazine, Simazine, Diuron
<i>Métaux</i>
Cadmium, Sélénium, Zinc, Mercure, Plomb, TBT
<i>PCBs</i>
Clophen A50, Aroclor 1242
<i>Alkylphénols</i>
Nonylphénol, Pentylphénol
<i>Stéroïdes de vertébrés naturels et synthétiques</i>
Testostérone, Œstrogènes, Diéthylstilbestrol
<i>Insecticides</i>
Pyriproxyfen, DDT, MCPA, Endrin, Toxaphène, Pipéronyl butoxide, Vinchlozoline Méthoprène, Endosulfan, Pentachlorophénol, Diflubenzuron, Kelthane
<i>Mélanges</i>
Effluents de tannerie, effluents papetiers, dérivés de pétrole brut, effluents urbains

Tableau 4 : Composés impliqués dans les mécanismes de perturbation endocrinienne chez les invertébrés (Depledge & Billingham, 1999).

Une concertation entre l'Organisation de Coopération et Développement Economique (OCDE), l'Union Européenne, des experts et divers partenaires, a établi les définitions suivantes pour les perturbateurs endocriniens (OCDE, 1997):

« Un perturbateur endocrinien potentiel est une substance ou un mélange exogène possédant des propriétés susceptibles d'induire une perturbation endocrinienne dans un organisme intact, chez ses descendants ou (sous-)populations. ».

« Un perturbateur endocrinien est une substance ou un mélange exogène altérant les fonctions du système endocrinien et induisant donc des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou (sous-)populations. »

Tous les écosystèmes sont exposés à de nombreux perturbateurs endocriniens, qui ont tout d'abord été des substances naturelles auxquelles se sont rajoutées les substances synthétiques. Un grand nombre d'entre eux sont des contaminants bioaccumulables, liposolubles et persistants (PCB, organochlorés). Ils se retrouvent dans une vaste variété d'herbicides, fongicides, insecticides, détergents, matières plastiques (bisphénol A, nonylphénol-polyéthoxylates), dans les hormones de synthèse (diéthylstilbestrol) et naturelles (œstrogènes, phytoœstrogènes, testostérone).

Les perturbateurs endocriniens sont capables d'altérer le fonctionnement endocrinien normal en agissant selon différents modes d'actions :

- en interférant avec la synthèse d'une hormone endogène *via* les sites de contrôle de cette synthèse, comme par exemple un dysfonctionnement de la thyroïde des vertébrés tel que rapporté chez les alligators exposés à du Dicofos (DDT et DDE) (Crain & Guillette, 1997) entraînant la féminisation des mâles et une « superféminisation » des femelles ce qui a engendré une baisse du succès reproducteur des alligators et *a fortiori* de la croissance de la population.

- en altérant la fonction de protéines qui se lient normalement avec les stéroïdes endogènes (androgènes ou œstrogènes) auxquels ils se substituent (Danzo, 1997; Tollefsen, 2002).

- en mimant l'action des hormones *via* l'activation de récepteurs hormonaux qui contrôlent la synthèse de certains gènes. Dans ce cas, les perturbateurs endocriniens peuvent agir comme agoniste en mimant l'action d'une hormone endogène et donc activer le récepteur nucléaire. Ils peuvent aussi agir comme antagoniste et bloquer le récepteur. Ce blocage du récepteur empêche son activation par liaison avec le stéroïde et donc la transcription de gènes qui sont sous son contrôle (Arnold, *et al.*, 1996; Tyler, *et al.*, 1998). Une telle interaction a été démontrée *in vitro* chez les poissons exposés à différentes familles de contaminants (Le Menn, *et al.*, 1980; Donohoe & Curtis, 1996; Knudsen & Pottinger, 1999). *In situ*, l'effet agoniste avec le récepteur œstrogénique est fréquemment répertorié chez les poissons exposés aux effluents urbains (Purdom, *et al.*, 1994).

- en perturbant les enzymes de la stéroïdogénèse et/ou l'élimination de l'hormone endogène. *In situ*, de nombreuses perturbations de la biotransformation des stéroïdes ont été observées chez différentes espèces de poissons exposés à des effluents d'usines de blanchiment de papier ou d'usines de pâtes et papiers (Munkittrick, *et al.*, 1992; Munkittrick, *et al.*, 1994), à des effluents urbains (Folmar, *et al.*, 1996) et à des PCB (Förlin & Anderson, 1984). Un tel phénomène est également décrit chez des invertébrés comme les gastéropodes exposés au tributylétain (TBT) (Ronis & Mason, 1996).

Les conséquences d'une exposition à des perturbations endocriniennes sont multiples. Elles peuvent altérer le développement des organismes (Colborn, *et al.*, 1993), leur reproduction et même leur comportement (Guillette, 2000). La nature et l'intensité des effets engendrés par cette exposition varient selon l'espèce considérée puisque l'implication des hormones dans les processus de contrôle métabolique est propre chaque espèce. Le moment et la durée de l'exposition au cours de la vie de l'individu sont également très importants car la sensibilité d'un organisme aux perturbateurs endocriniens peut varier avec le temps. En milieu naturel, les effets sur la reproduction, la survie ou la mortalité sont plus généralement exploités car facilement explorés chez les poissons exposés de manière chronique à différents types de contaminants comme les PCB ou le nonylphénol (Black *et al.*, 1998; Allen *et al.*, 1999), puisque l'endocrinologie des poissons est très bien connue (Hutchinson & Pickford, 2002; Ostrander & Rotchell, 2003).

Les effets les plus spectaculaires de perturbations endocriniennes sont les phénomènes de féminisation ou de masculinisation des individus. Ces phénomènes sont caractérisés par des composantes biochimiques (concentrations hormonales ou autres composés naturellement exclusifs à un sexe), l'apparition de caractères sexuels secondaires ou même de produits sexuels du sexe opposé dans la gonade.

La présence d'un ovotestis (présence de gamètes mâles et femelles dans la gonade) traduit un phénomène d'intersexe semblable à de l'hermaphrodisme. Ce phénomène a été observé chez des

tortues mâles et chez des poissons (Harshbarger, *et al.*, 2000; De Metrio, *et al.*, 2003; Stentiford, *et al.*, 2003). Une féminisation a également été rapportée *in situ*, avec l'apparition de caractères sexuels secondaires féminins, chez la gambusie du Golfe du Mexique (*Gambusia holbrooki*) exposée à des effluents d'usines de pâtes à papier. Les femelles étaient alors pourvues d'une nageoire anale semblable au gonopodium des mâles (Davis & Bortone, 1992).

A l'inverse du phénomène de féminisation des mâles, une masculinisation des femelles a été rapportée très fréquemment chez de nombreux mollusques gastéropodes exposés au TBT (Matthiessen, *et al.*, 1995; Matthiessen & Law, 2002). Cette masculinisation est appelée imposexe ou intersexe selon l'organe mâle qui se développe. Plusieurs études ont montré que le TBT est à l'origine d'une condition de pseudohermaphrodisme chez la femelle de néogastéropode (*Nassarius*, *Ilyanassa*, *Ocenebra*, *Ursalpinx*) caractérisée par le développement d'un pénis, d'un *vas-deferens* superficiel et de tubes séminifères (Davies, *et al.*, 1999) en plus de leurs propres organes génitaux qui restent fonctionnels (Spooner, *et al.*, 1991).

L'imposexe peut affecter plus de 150 espèces répertoriées de gastéropodes alors que l'intersexe concerne plus particulièrement l'espèce *Littorina littorea* (De Wolf, *et al.*, 2001). Ce dernier est caractérisé par la présence d'une prostate et par la stérilisation des femelles. Le résultat final de l'imposexe, tout comme de l'intersexe, demeure la stérilisation des femelles et de nombreux déséquilibres ont été rapportés dans les populations de zones côtières ou estuariennes fortement contaminées par le TBT.

Bien que *C. fluminea* soit une espèce hermaphrodite (protandre ou simultanée) (Kraemer, 1978; Kraemer, *et al.*, 1986), la perturbation endocrinienne devrait exprimer ses effets non pas en effectuant un changement de sexe, mais en favorisant l'un plutôt que l'autre. La quantification indirecte de la vitellogénine et les coupes histologiques des gonades pourraient nous permettre d'identifier le phénomène.

II.D Marqueurs généraux de stress

II.D.1 Les lysosomes

Vers la fin du 19^{ème} siècle, Metchnikoff et ses disciples ont émis l'idée que le matériel phagocyté pouvait être digéré dans des compartiments intracellulaires acides contenant des enzymes (Holtzmann, 1989). Ces compartiments furent nommés plus tard lysosomes.

Les lysosomes sont des organelles polymorphiques subcellulaires limitées par une membrane semi-perméable de lipoprotéines contenant des enzymes hydrolytiques. Ces enzymes ont divers rôles intra- et extra-cellulaires (de Duve & Wattiaux, 1966). Les lysosomes interviennent dans divers mécanismes :

- séquestration des composés étrangers,
- aspects de la réponse immunitaire,
- digestion intracellulaire,
- implication dans la reproduction ; développement embryonnaire et apoptose.

D'autres fonctions incluent le remplacement des protéines et des organelles, et contribuent au renouvellement cellulaire (Adema, *et al.*, 1991).

II.D.1.1 Classification

Les lysosomes sont habituellement considérés comme le compartiment terminal de dégradation de la voie d'endocytose (Kornfeld & Mellman, 1989) et jouent un rôle important dans la dégradation de matériel phagocyté (Funato, *et al.*, 1997), l'autophagie (Lawrence & Brown, 1992), la crinophagie (Noda & Farquhar, 1992) et dans la protéolyse des protéines cytosoliques transportées à travers la membrane lysosomiale par un mécanisme de transport (Cuervo & Dice, 1996). Les hydrolases lysosomiales sont capables de dégrader n'importe quel matériel biologique (Goldman, 1976). Ainsi, la déstabilisation des membranes lysosomiales entraîne la libération des hydrolases qui sont létales pour les cellules. En effet, ces enzymes sont capables de lyser les composés cellulaires (de Duve & Wattiaux, 1966; Goldman, 1976). Les hydrolases sont séquestrées sous une forme inactive à l'intérieur d'une membrane épaisse afin d'empêcher le libre accès aux constituants cellulaires.

Les lysosomes, suivant leur état fonctionnel (Figure 22), se classent en:

- lysosomes primaires, organites néoformés à partir de l'appareil de Golgi qui ne sont pas encore intervenus dans les phénomènes de dégradation,
- lysosomes secondaires, qui se divisent en :
 - hétérolysosomes (vacuoles hétérophagiques) qui résultent de la fusion d'un lysosome primaire avec un phagosome pour aboutir à la constitution d'un phagolysosome ou d'un endolysosome. Dans le cas de la formation d'un hétérolysosome à partir de vacuole d'endocytose, les endosomes se forment à partir de puits recouverts (molécules de clathrine), perdent leur revêtement de clathrine et passent séquentiellement dans le compartiment endosomal. Ce compartiment endosomal, après fusion avec les lysosomes primaires, se transforme en un compartiment endolysosomal.
 - autophagolysosomes (vacuoles autophagiques ou cytolysosomes) formés par la fusion de lysosomes primaires avec une partie du cytoplasme qui s'est isolée par une membrane.
- Lysosomes tertiaires ou « corps résiduels » provenant soit des hétérolysosomes soit des autophagolysosomes et qui contiennent encore des substances non digérées et des hydrolases. Le contenu des corps résiduels peut rester indéfiniment dans le cytoplasme

sous forme de granule de lipofuscine et s'accumuler dans la cellule ou être expulsé en dehors.

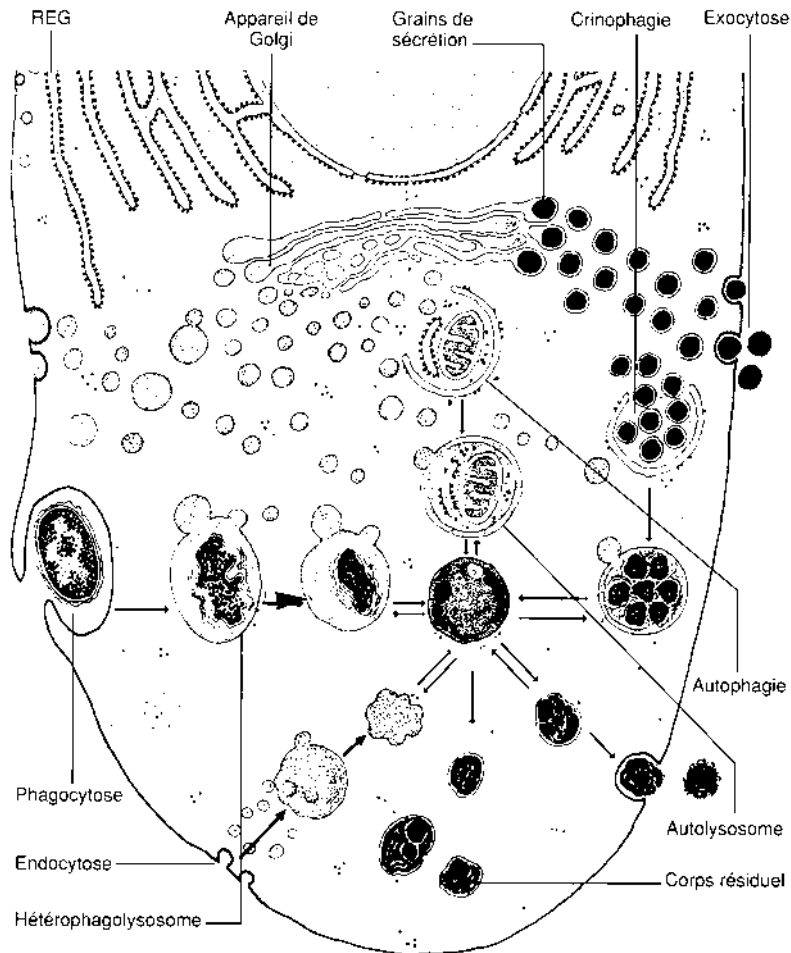


Figure 22 : Lysosomes, hétérolysosomes et vacuoles autophagiques (Maillet, 1992)

II.D.1.2 Les lysosomes primaires

Le lysosome primaire est un organite cellulaire limité par une membrane, qui se retrouve dans tous les types cellulaires (sauf dans les hématies). Les enzymes lysosomiales et les protéines membranaires spécialisées sont synthétisées par le réticulum endoplasmique et sont transportées par l'appareil de Golgi. Les lysosomes se forment alors par bourgeonnement des saccules trans. Les lysosomes se présentent sous la forme de « corps denses » arrondis ou ovalaires. Leur diamètre varie de 25/50 nm à 1,5 µm. Leur contenu est homogène, dense aux rayons électroniques (Holtzmann, 1989). Ils contiennent des hydrolases qui ne sont pas encore intervenues dans les processus de catabolisme. Ces hydrolases (Tableau 5) sont conservées dans un environnement acide (pH 4,6) maintenu par une pompe à protons Mg^{2+} -ATPase dépendant (Ohkuma, *et al.*, 1987).

II.D.1.3 Les lysosomes secondaires

Ils peuvent se définir comme étant des lysosomes impliqués dans les phénomènes de digestion cellulaire. Ils résultent de la fusion des lysosomes primaires avec les phagosomes ou les autophagosomes.

II.D.1.3.a Les hétérolysosomes

Ils résultent de la fusion des lysosomes primaires soit avec des phagosomes, soit avec des vésicules de pinocytose, soit avec des endosomes ou le compartiment endosomal.

Le phagosome initial, petite enclave du milieu extérieur séparée du cytoplasme par un segment de la membrane plasmique, quitte rapidement son lieu d'origine, la périphérie cellulaire, et se dirige vers le centre de la cellule (il en est de même pour les vésicules coatées ; leur mouvement intracellulaire dépend des microtubules et des microfilaments d'actine). Pendant cette migration, il se fragmente par bourgeonnement ou bien il s'associe par fusion à d'autres phagosomes. Sa course s'achève lorsque sa membrane fusionne avec la membrane plasmique ou celle d'un lysosome primaire.

La fusion des lysosomes primaires et des phagosomes va former des vacuoles hétérophagiques. Les lysosomes viennent au contact de la membrane du phagosome qui se rompt afin que les enzymes soient libérées directement dans le phagosome. Ce dernier devient alors une vacuole hétérophagique. Ces vacuoles ont la propriété de concentrer des substances puisées dans le milieu extracellulaire.

FONCTION	ENZYMES
Transférases des groupes contenant du phosphore	
Nucléotidyltransférases	Ribonucléase
Action sur les liaisons ester	
Hydrolases carboxyl-ester	Estérase Lipase Phospholipase A ₁ et A ₂
Hydrolases thiolester	Hydrolase hydroxyisobutyryl-CoA Hydrolase Alanyl-CoA
Hydrolases phosphorique monoester	Phosphatase acide Phosphatase phosphatidate Phosphatase phosphoprotéine
Hydrolases phosphoriques diester	Phosphodiesterase (exonucléase) Phospholipase C Désoxyribonucléase II
Hydrolases sulphurique ester	Arylsulphatase A et B Chondrosulfatase
Action sur les composés glycosylés	
Hydrolases glycoside	Dextranase [α -(1→6)-glucosidase] Lysozyme (muramidase) α -glucosidase β -glucosidase α -galactosidase β -galactosidase α -mannosidase α -acétylglucosaminidase α -acétylgalactosaminidase β -glucuronidase Hexosaminidase Hyaluronidase β -xylosidase α -L-fucosidase
Actions sur les liaisons peptidiques	
Hydrolases acide peptidyl amine	Carboxypeptidase Cathepsine A Hydrolase acétylphénylalaninetyrosine Carboxypeptidase acide
Dipeptidehydrolases	Dipeptidase
Peptidylpeptide hydrolases	Cathepsine B1 et B2 Cathepsine C Cathepsine E Rénine Collagénase Protéase neutre Activateur kiminogène Activateur plasminogène
Action sur des liaisons C-N, autres que peptidiques	
Amides linéaires	Amino acide naphthylaminidases Dipeptide naphthylaminidases Aspartylglucosylaminase Céramidase
Action sur les liaisons anhydres	
Anhydres contenant des groupes phosphoryl	Pyrophosphatase Arylphosphatase
Action sur les liaisons P-N	Phosphoamidase

Tableau 5 : Principale composition enzymatique des lysosomes (Allison, 1974)

Les vacuoles jouent un rôle dans la nutrition cellulaire puisqu'elles permettent la dégradation des aliments solides ou liquides capturés par la cellule en constituants utilisés comme matériaux de synthèse. Elles entrent également dans les fonctions de défense de l'organisme ; les lysosomes protègent la cellule contre les agressions pathogènes. Les bactéries et les virus sont phagocytés et détruits par les enzymes lytiques. Les substances toxiques sont également dégradées par les lysosomes.

II.D.1.3.b *Les autolysosomes*

Les vacuoles autophagiques sont des vacuoles dans lesquelles les propres structures de la cellule sont détruites.

Le réticulum endoplasmique lisse, par un mouvement d'enroulement, entoure le territoire lésé (mitochondrie, par exemple), formant un autophagosome. Les lysosomes primaires viennent alors y déverser leur contenu.

L'autophagie est un mécanisme grâce auquel la cellule se débarrasse des organites et des fragments cytoplasmiques hors d'usage sans perte de leurs constituants chimiques qui seront réutilisés par la cellule. En état de jeûne, l'autophagie assure la nutrition cellulaire, en effet, la cellule utilise ses propres substances qu'elle digère afin d'assurer les fonctions les plus élémentaires.

L'autophagie permet la destruction des cellules mortes ; les cellules sont digérées par les enzymes de leurs propres lysosomes dont les membranes se sont rompues au cours de la nécrose cellulaire.

II.D.1.4 La sécrétion régulée des lysosomes

La plupart des cellules stockent leurs produits de sécrétion dans des granules sécréteurs spécialisés qui peuvent fusionner avec la membrane plasmique. Inversement, les composés tels que les protéines, les lipides et les peptides sont retirés de la membrane plasmique par le processus d'endocytose. La charge est alors amenée au lysosome pour être dégradée. Cependant, quelques cellules ont modifié leur compartiment lysosomal afin qu'il fonctionne également comme compartiment sécréteur (Andrews, 2000; Blott & Griffiths, 2002).

Cette double fonction d'organelle sécrétoire lysosomal (ou lysosome sécréteur) n'est pas commune dans le fait qu'en plus de la principale fonction conventionnelle des lysosomes (la dégradation des protéines), elle est aussi utilisée pour le stockage des protéines sécrétoires néosynthétisées.

Les lysosomes sécréteurs partagent plusieurs traits en commun avec les lysosomes conventionnels, par exemple, ils sont acides et contiennent des protéines de dégradations adéquates. Cependant, ils se distinguent par leur capacité à subir des sécrétions régulées. Cette exocytose est régulée par la mobilisation intracellulaire de Ca^{2+} qui va agir en tant que signal pour la dégranulation. Une fois stimulés, les lysosomes sécréteurs sont acheminés vers le site de stimulation le long de microtubules et utilisent ensuite des mouvements basés sur l'actine pour rejoindre la membrane plasmique avec laquelle ils vont fusionner.

II.D.2 **Conséquences d'une exposition aux xénobiotiques**

Les conséquences vont dépendre de la nature des xénobiotiques. Dans le cas d'agents thérapeutiques, l'action est contrôlée; l'interaction entre le produit chimique et le lysosome va avoir lieu selon des processus connus pour obtenir un impact ciblé (Kobayashi, *et al.*, 1981; Belenky, 1984; Lenti, *et al.*, 1986). Ce n'est pas le cas pour les contaminants environnementaux dont les concentrations, les compositions et les interactions varient les unes par rapport aux autres rendant difficile la prédiction de leur impact sur le biote. Une exposition chimique peut avoir des effets

stabilisants (Alamo, *et al.*, 1995) ou déstabilisants (Abok, *et al.*, 1983; Nott & Moore, 1987; Camus, *et al.*, 2000; Shepard & Bradley, 2000) sur la membrane lysosomiale et entraîner également l'activation (Varute & More, 1973) ou l'inhibition (Imanaka, *et al.*, 1983; Livi, *et al.*, 1985 ; Patel, *et al.*, 1988) des hydrolases acides dans le lysosomes.

Nous nous intéresserons plus particulièrement au compartiment lysosomal des cellules du diverticule digestif. En effet, ces cellules assurent une part importante dans la dégradation des aliments chez les bivalves (Owen, 1972), de plus, les lysosomes de ce compartiment ont fait l'objet de nombreuses études chez divers invertébrés aquatiques:

- le nautilus (Westermann & Schipp, 1998),
- la moule (Viarengo, *et al.*, 1985; Marigómez, *et al.*, 1996a; Tremblay, *et al.*, 1998; Da Ros, *et al.*, 2000; Lowe & Fossato, 2000),
- les littoridés (Moore & Halton, 1977; Marigómez, *et al.*, 1990),
- la mye (Tremblay & Pellerin-Massicotte, 1997),
- la moule zébrée (Giamberini & Pihan, 1997),
- la daphnie (Schultz & Kennedy, 1976).

II.D.3 Utilisation des lysosomes comme biomarqueur

Plusieurs auteurs ont défini les réponses lysosomiales comme de bons biomarqueurs pour leurs caractéristiques :

- disponibilité des lysosomes dans tous les tissus d'un organisme et à tous les niveaux trophiques de l'écosystème,
- quantification possible de la réponse du biomarqueurs par l'analyse d'images automatisée,
- corrélation de la réponse du biomarqueur à la durée et au niveau d'exposition à l'agent stressant (Pellerin-Massicotte *et al.*, 1993),
- intégration des effets de plusieurs facteurs de stress.

Matériel et méthodes

III Matériels et méthodes

III.A Choix des techniques

Le choix des techniques a été orienté en fonction de leur disponibilité dans le laboratoire, dans la bibliographie ou parmi les différentes collaborations (notamment celles du projet BEEP). Si elles sont majoritairement régulièrement appliquées sur les organismes marins (moules, huîtres, poissons) ou quelques mollusques d'eau douce (moule zébrée, lymnée), ces techniques sont quasiment inexistantes sur *C. fluminea*. Il donc a fallu les transférer au laboratoire, avant de les adapter sur *C. fluminea*, pour être applicables lors des expérimentations en milieu semi-contrôlés (mésocosmes).

III.A.1 Génotoxicité

III.A.1.1 Dosage de la 8-oxodG

Parmi les différentes techniques utilisées pour la mesure des bases oxydées (Cadet, *et al.*, 1997), celle utilisant la chromatographie liquide haute pression couplées à un détecteur électrochimique (CLHP-DE) a été la plus utilisée en raison de sa très grande sensibilité et de sa simplicité relative (Floyd, *et al.*, 1986; Kaur & Halliwell, 1996). Cette technique présente l'avantage de coupler une technique de séparation spécifique des différentes bases de l'ADN (CLHP) à une méthode de détection tout aussi sensible des produits électrochimiquement actifs. Cette technique a déjà fait l'objet de différents types de mises au point (Garcin, 1998; Akcha, 2000; Tavan, 2001) et est fréquemment utilisée dans le laboratoire (Morin, *et al.*, 2003).

La mesure de la 8-oxodG peut être résumée en plusieurs étapes (Figure 23) :

Première étape : L'ADN du tissu est isolé et digéré en 2' désoxyribonucléosides par voie enzymatique (nucléase P1 et phosphatase alcaline). Les protéines sont précipitées pour purifier les nucléosides avant l'injection en CLHP-DE pour séparation.

Deuxième étape : L'analyse par CLHP permet non seulement la séparation des 2'-désoxyribonucléosides normaux mais également la séparation des 2'-désoxyribonucléosides oxydés. La 8-oxodG étant un composé apolaire, l'utilisation de colonnes de silice, notamment de type octadésylsilyle (ODS), est particulièrement recommandée. L'élution est réalisée en mode isocratique dans un tampon d'électrolytes permettant l'établissement d'un courant de base au niveau des électrodes du détecteur électrochimique. Ce tampon contient également un faible pourcentage de méthanol pour l'élution des molécules hydrophobes.

Troisième étape : De façon à permettre l'expression des résultats en nombre de lésions/10⁶ dG, l'éluat est d'abord acheminé au niveau d'un détecteur UV de façon à permettre la mesure qualitative des différents 2'-désoxyribonucléosides normaux de l'ADN.

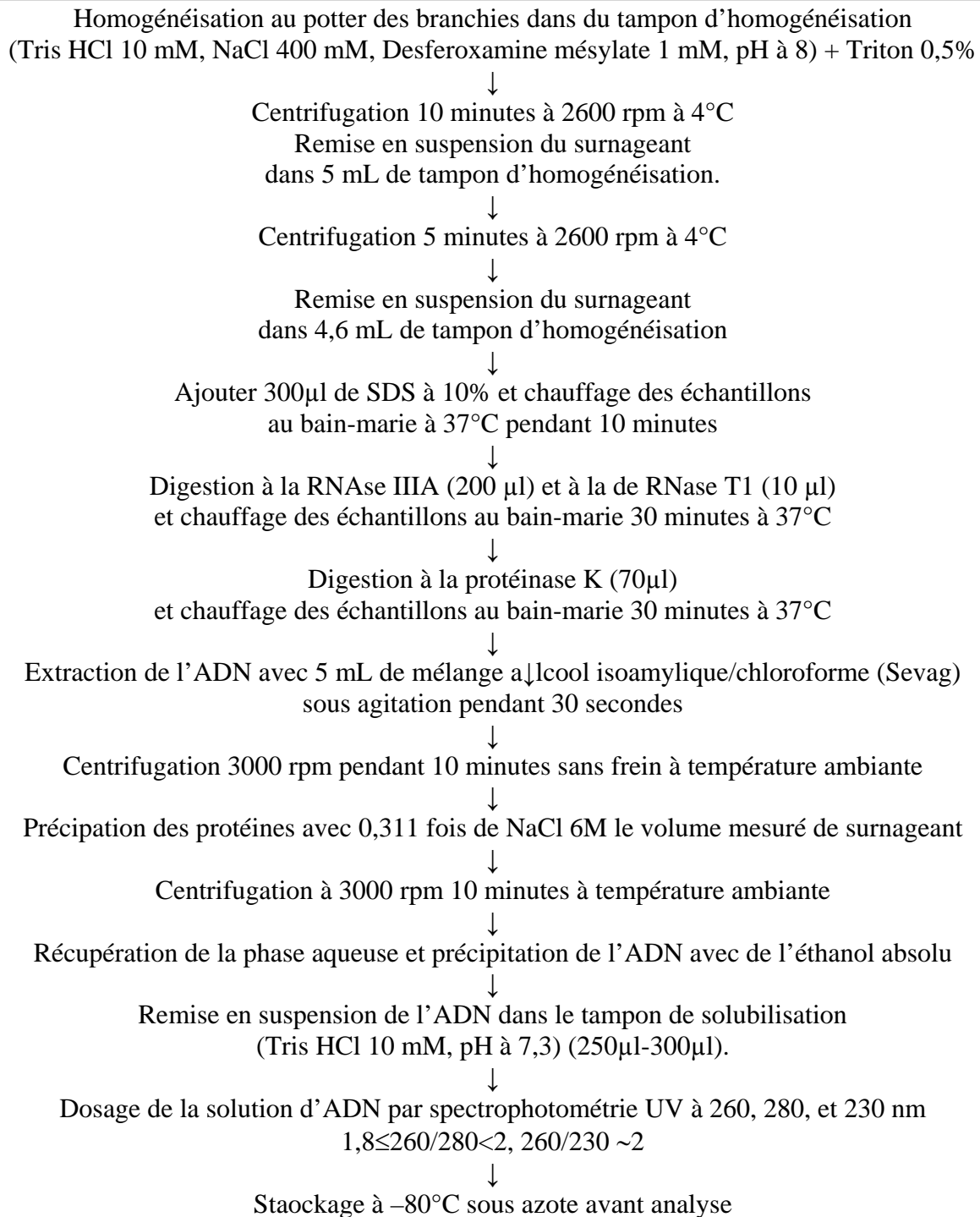


Figure 23 : Protocole d'extraction d'ADN

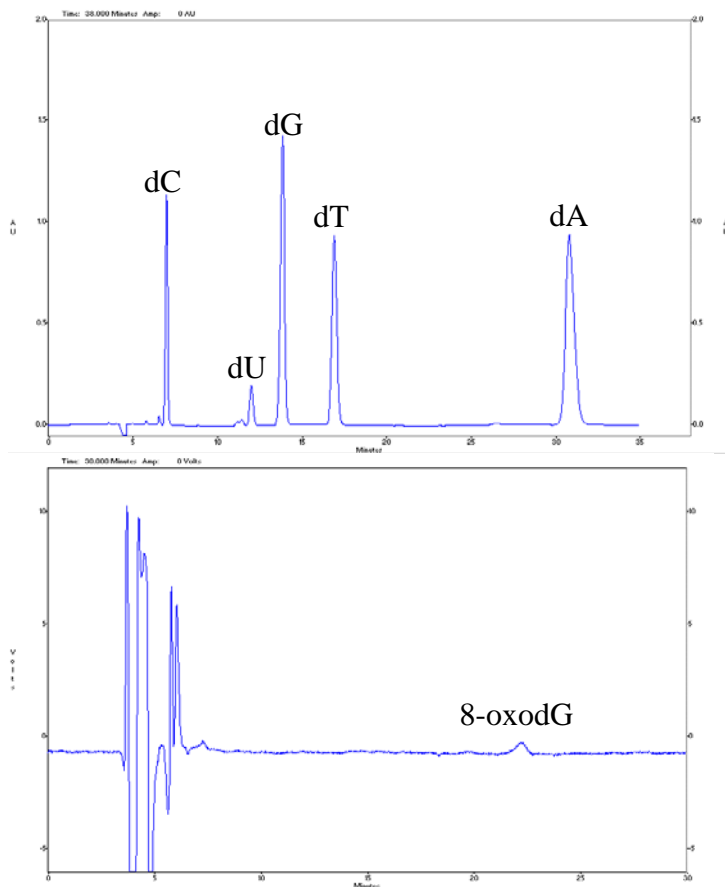
Analyse des bases en chromatographie liquide haute pression (CLHP)

La séparation des bases de l'ADN est effectuée par chromatographie de partage. Nous avons utilisé une pompe HPLC Beckman équipée d'une précolonne « Uptisphere » (ODB, 250mm×4,6mm×5µm, Interchrom). La phase mobile (10 mM acide citrique, 25 mM acétate de sodium, 30 mM NaOH, 10 mM acide acétique, pH 5,3, 10% méthanol) circule en mode isocratique avec un débit de 0,8 mL/min.

La détection des bases normales est effectuée à l'aide d'un détecteur UV réglé à 254 nm, la détection des bases oxydées est effectuée par un détecteur électrochimique avec une sensibilité de 0,5 nA/V et un potentiel d'oxydation de 650 mV.

Pour connaître les temps de rétention et effectuer les gammes étalons, il faut injecter des quantités connues de désoxyguanosine normales et de 8-oxodG pures (environ de 5 à 30 nmoles pour les bases normales en UV et de 5 à 500 fmoles pour la 8-oxodG en électrochimie).

Les échantillons sont maintenus à une température de 6°C dans un injecteur automatique. 100 µl sont injectés. Il n'est cependant pas nécessaire de connaître la quantité exacte d'ADN injecté ; le taux de 8-oxodG est exprimé par rapport à la quantité de 2'-désoxyguanosine (nombre de bases oxydées pour 10⁶ bases normales). Pour cela, il sera procédé à une double détection en série (spectrophotométrique et électrochimique) à la sortie de la colonne afin de quantifier respectivement le nucléoside normal (dG) et le nucléoside modifié (8-oxodG). La quantification s'effectue par le passage d'une gamme de 8-oxodG et de dG pour lesquelles la hauteur ou l'aire sous les pics (logiciel Gold Nouveau - Beckman) est mesurée.



Temps de rétention des bases :

dC : désoxycytosine ≈ 6 min

dU : désoxyuridine ≈ 12 min

dG : désoxyguanosine ≈ 14 min

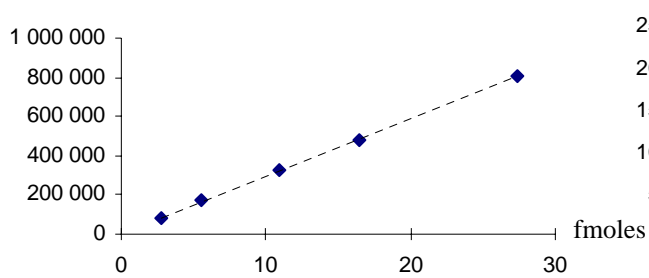
dT : désoxythymine ≈ 17 min

dA : désoxyadénine ≈ 32 min

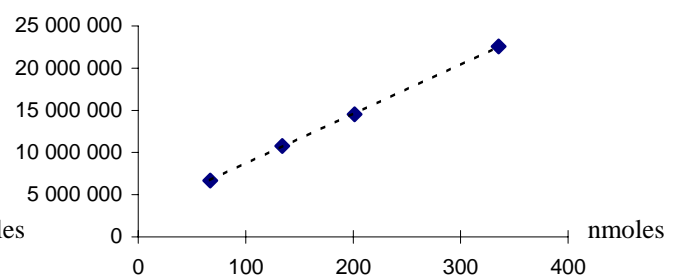
8-oxodG ≈ 22 min

Chromatogrammes de rétention des bases normales et azotées

Gammes de 8-oxodG et de dG



Hauteur des pics de dG
 $y = 2,95 \cdot 10^4 x + 2,88 \cdot 10^3$ $R^2 = 0,9996$
 $x = \text{quantité de bases normales en nanomoles}$



Aire sous les pics de 8-oxodG
 $y = 5,90 \cdot 10^4 x + 2,76 \cdot 10^6$ $R^2 = 0,9998$
 $x = \text{quantité de 8-oxodG en femtomoles}$

III.A.1.2 Test du désassemblage de l'ADN (*DNA unwinding*)

Cette technique provient de l'Institut d'Ecologie – Section Ecotoxicologie de l'Université Technique de Berlin (Pr. P.D. Hansen).

Ce test de génotoxicité permet de mesurer les taux de désassemblage de l'ADN (rapport des concentrations en simples et doubles brins). Lors d'une exposition à un xénobiotique provoquant des dommages à l'ADN, la cellule va effectuer des réparations pour sauvegarder son intégrité. Ces réparations font intervenir divers types d'enzymes. Ces enzymes ont besoin d'avoir accès aux bases lésées, pour cela l'ADN va subir un dénouement, puis un désappariement des deux brins d'ADN.

Ce test (Figure 24) part du principe que, plus il y a de réparations nécessaires, plus l'ADN sera déroulé et désassemblé et donc les quantités d'ADN simple-brin seront plus importantes que chez un organisme sain (témoin). L'addition d'un marqueur de fluorescence s'intercalant entre les bases permettra de déterminer au lecteur microplaque le ratio ADN simple-brin/ADN double-brin. En connaissant le rapport pour les organismes exposés et non-exposés, on peut calculer le nombre relatif moyen de lésions à l'ADN dues aux expositions par unité désassemblée (c'est-à-dire la distance moyenne entre les points de désassemblage de l'ADN).

Toutes les étapes sont menées en gardant les échantillons dans la glace (contrôle strict de la température).

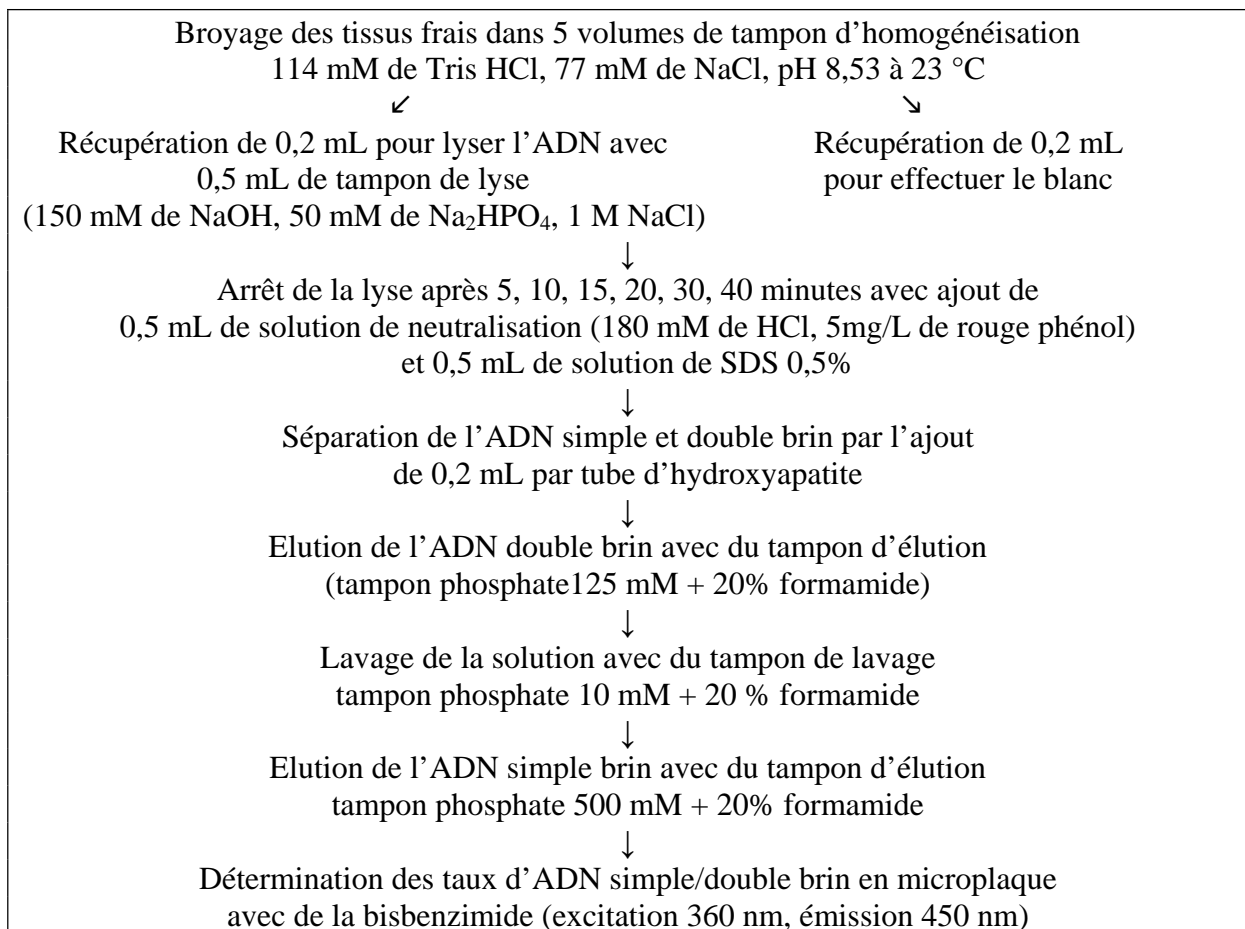


Figure 24 : Protocole de séparation de l'ADN simple/double brin

Les résultats des mesures en fluorescence donnent le rapport F :

$$F = \frac{\text{ADN db}}{\text{ADN sb} + \text{ADN db}}$$

où **ADN db** est la fluorescence mesurées dans les puits contenant l'ADN double-brin et **ADN sb** celle de l'ADN simple-brin.

Pour rechercher une différence par rapport au témoin, on utilise la formule :

$$p = \frac{-\log F_{\text{échantillon}}}{-\log F_{\text{témoin}}}$$

Le logarithme négatif de F [-log F] est proportionnel au nombre de point de désassemblage de l'ADN et donc son degré de fragmentation. On considère qu'il y a un effet génotoxique pour $p > 1,6$.

Il est donc indispensable de connaître le taux de base d'ADN simple-brin naturellement présent.

III.A.2 Immunotoxicité

L'immunotoxicité est évaluée par la mesure de l'activité de phagocytose des hémocytes. Deux techniques de dosages de cette activité ont été appliquées. Elles ont été toutes deux utilisées dans le programme européen BEEP. L'une par le Laboratoire d'Etudes de l'Environnement Marin (LEMAR) de l'Université de Bretagne Occidentale, Brest (M.Auffret), faisant appel à des microbilles de latex (YG 2 μm), et l'autre, par l'Institut d'Ecologie – Section Ecotoxicologie de l'Université Technique de Berlin (Pr. P.D. Hansen), employant des levures (*Saccharomyces cerevisiae*) marquées à la fluorescéine isothiocyanate (FITC).

Prélèvement de l'hémolymphe

L'hémolymphe est prélevée, par un trou pratiqué entre les 2 valves, dans le muscle adducteur postérieur à l'aide d'une aiguille de 26-G montée sur une seringue de 1 mL.

L'hémolymphe est ensuite déposée dans un tube eppendorf de 1,5 mL dans la glace, avant utilisation. A cette étape, il est important de vérifier l'osmolarité de l'hémolymphe (100 μl) prélevée pour ajuster les solutions utilisées par la suite. 100 μl d'hémolymphe sont déposés dans chaque puits de la microplaque.

Les hémocytes prélevés sont alors comptés afin de déterminer une quantité maximale et minimale retirée lors des prélèvements, on obtient entre 357 000 et 1 755 000 cellules par millilitres (Blaise, *et al.*, 2002b).

Afin de permettre aux hémocytes d'adhérer à la paroi, le temps optimum d'incubation a été déterminé à 90 minutes.

Ensuite, le surnageant est enlevé et remplacé par les solutions contenant les microbilles de latex ou les levures.

L'osmolarité de l'hémolymphe a été contrôlée à l'aide un osmomètre à pression de vapeur *Wiescor* et/ou un osmomètre à point de congélation *Roebing* afin que les milieux d'incubation soient isoosmotiques. L'osmolarité mesurée est de 59 ± 5 mOsm (moyenne sur 20 animaux) (par comparaison, un tampon phosphate 0,1 M pH=7,3 se situe à 224 mOsm). Elle correspond à celle retrouvée chez d'autres bivalves d'eau douce tel que *Lampsilis terestre* (Jordan & Deaton, 1999).



III.A.2.1 Technique avec les microbilles de latex

Solutions

Milieu d'incubation des hémocytes (MIH) :

Ce milieu a été adapté pour avoir une osmolarité proche de celle de l'hémolymphe.

tampon Tris.HCl	16 mM	pH 7.6
D-glucose	1,6 mM	
CaCl ₂	2,9 mM	
MgCl ₂	5,4 mM	
Albumine	2 mg/mL	

Suspension stock de microbilles : microsphères fluoresbrite YellowGreen 2 μ m de diamètre - Polyscience Europe (098447-5). Homogénéiser la suspension stock et en déterminer la concentration en billes (estimée à $5,86 \cdot 10^6$ billes/ μ l par comptage avec une cellule de Malassez)

Suspension de travail de microbilles : déposer 21 μ l de suspension stock de microbilles dans 2 mL de milieu d'incubation des hémocytes (MIH) ($60 \cdot 10^6$ billes/mL). Conserver à l'obscurité.

Mesure de l'activité de phagocytose

100 μ l de suspension de travail ($6 \cdot 10^6$ billes/puits) sont déposés dans les puits contenant les hémocytes.

Les microplaques sont placées pendant 90 min à l'obscurité à 20°C (incubateur).

Après une aspiration légère du surnageant, 50 μ l de trypsine (2mg/mL de MIH) sont ajoutés par puits pour décoller les hémocytes (5 min à 4°C).

Les hémocytes sont alors fixés avec du paraformaldéhyde 1% (concentration finale dans le puits) pour permettre leur conservation.

Les puits sont scellés et la microplaque enveloppée dans du papier d'aluminium pour conserver la fluorescence des microbilles, puis stockée à 4°C (maximum 30 jours).

Les mesures en fluorescence sont effectuées au *cytomètre en flux* (FACScan – Becton Dickinson Immunochemistry systems) (Figure 25) en détection en FL1. Seules les cellules ayant phagocyté 3 billes (M1, Figure 27) ou plus sont comptabilisées. 10 000 cellules sont comptées dans la fenêtre M1 pour effectuer les pourcentages des cellules ayant une activité de phagocytose.

Les mesures ont été effectuées avec le cytomètre en flux du Laboratoire de Physique des Interactions Ondes-Matière (PIOM) (Pr. A. Vernet) de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie et Physique de Bordeaux (ENSCP).

Principe du cytomètre en flux

La cytométrie en flux (Figure 25) est une technique qui s'est développée aux Etats-Unis avec pour objectif initial le dénombrement de cellules en suspension et l'évaluation de leur taille (Crosland-Taylor, 1953). Elle permet une analyse de chaque cellule au sein d'une population.

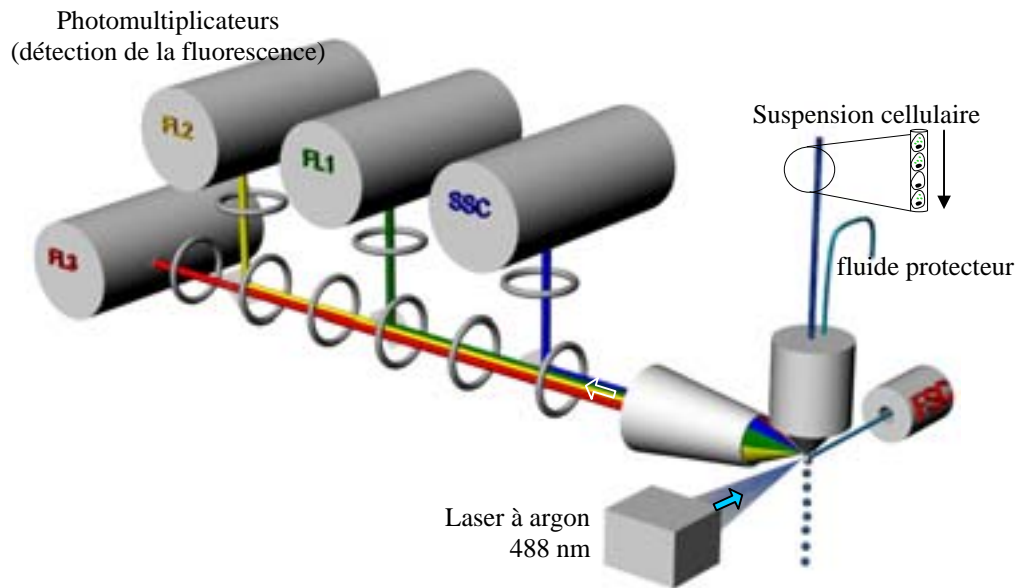


Figure 25 : Schéma de représentation du cytomètre en flux

Le principe général du fonctionnement est de guider, de manière hydrodynamique et à vitesse constante, une suspension de cellules isolées en assurant leur défilement « en file indienne » vers une zone de détection qui permet la génération de signaux optiques et électriques caractérisant les cellules. La suspension, composée de cellules ou constituants subcellulaires (noyaux, chromosomes, mitochondries...), est alignée par une veine liquide sous pression, et chaque particule est éclairée individuellement par un faisceau laser à l'argon refroidi à l'air délivrant une excitation à 488nm. Elle émet alors différents signaux optiques recueillis et analysés simultanément en temps réel ou différé, à raison de 1000 à 2000 particules par seconde. Les signaux émis correspondant à l'absorption, la diffusion (variable avec la taille ou certaines propriétés du cytoplasme) sont captés dans 2 directions : face à l'arrivée du laser (**FSC** : *Forward Scattered*) et suivant un angle de 90°C (**SSC** : *Side Scattered*), permettant de trier les cellules selon leur morphologie (Figure 26).

Avec les paramètres de granularité, de taille et de fluorescence, on obtient un histogramme de distribution de la population des hémocytes en fonction du nombre de microsphères qu'ils ont phagocytées.

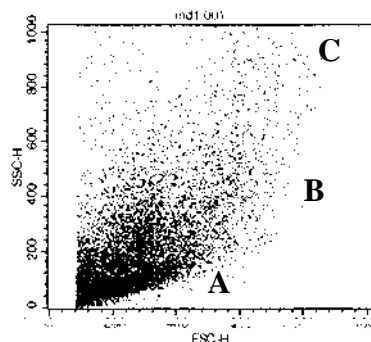


Figure 26 : Distribution des cellules en fonction de leur taille (FSC-H) et de leur complexité (granulation) (SSC-H).

Cette figure montre la présence de 3 sous-populations : **A**. cellules similaires morphologiquement (hyalinocytes), **B**. cellules hétérogènes (granulocytes), **C**. agrégats ou ensembles hétérogènes de cellules.

Les signaux de fluorescence et de SSC émis par les cellules sont collectés par un système de lentilles, de filtres de couleur, de miroirs et déviés vers 3 photomultiplicateurs : **FL1** pour les

émissions dans le vert, **FL2** pour les émissions dans le jaune/orange et **FL3** pour les émissions dans le rouge). Les signaux sont alors convertis en impulsions électriques, amplifiées puis analysés et traités par ordinateur (Figure 27).

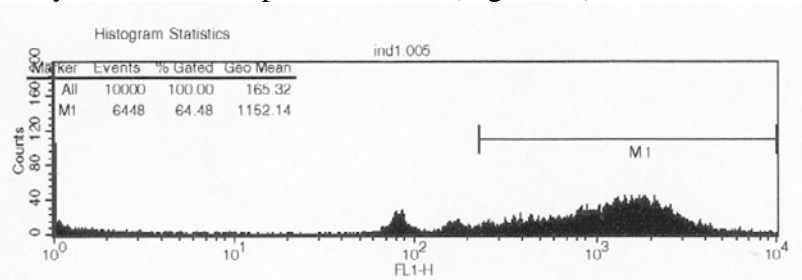


Figure 27 : Analyse cytométrique de l'activité de la phagocytose par les hémocytes des sphères fluorescentes.

Les pics représentent la fluorescence du nombre de microsphères par hémocytes (M1 mesure le pourcentage de fluorescence émise par les hémocytes ayant 3 microsphères ou plus).

Pour effectuer les statistiques, un nombre de 10 000 événements a été considéré pour chaque échantillon. Le comptage des hémocytes s'arrête lorsque 10 000 cellules contenant 3 microsphères fluorescentes ou plus (M1) ont été dénombrées (Figure 27).

III.A.2.2 Technique avec les levures

Cette technique a été décrite chez le bivalve *Mya arenaria* (Blaise, *et al.*, 2002b) et a fait l'objet d'une adaptation pour les organismes d'eau douce (compatibilité des solutions avec l'osmolarité de l'hémolymphe).

Mesure de l'activité de phagocytose

Une fois que les hémocytes ont adhéré à la microplaque, 100 µl de la solution de levures (*Saccharomyces cerevisiae*) marquées à la fluorescéine isothiocyanate (FITC 10mg/100 mL) diluées sont ajoutés (dans une proportion de 10 à 50 levures par hémocyte). Le temps d'incubation optimum des hémocytes avec les levures est de 90 minutes à 20°C.

Le surnageant est ensuite délicatement retiré et les hémocytes sont rincés deux fois avec le tampon phosphate (KH₂PO₄ 2,3 mM, Na₂HPO₄ 3.8 mM, NaCl 8,5 mM, KCl 10 mM, pH 7,52) pour enlever le surplus de levures.

L'action du bleu trypan (100 µl d'une solution à 1mg/mL), pendant 15 minutes à l'obscurité à température ambiante, permet d'éliminer (solution quençante) la fluorescence parasite des levures n'ayant pas été phagocytées.

Lire au lecteur de microplaque en fluorescence à 485 nm en excitation et 535 nm en émission (pic du FITC).

Pour déterminer l'indice de phagocytose, les valeurs en fluorescence doivent être ramenées à la quantité de cellules présentes par un dosage de protéines.

Indice de phagocytose :

On calcule une unité de fluorescence (RFU) par millilitre d'hémolymphe :

$$RFU = \frac{\text{fluorescence du contrôle} - \text{fluorescence de l'échantillon}}{\text{volume de l'échantillon} (\mu\text{l})} \times 1000 \mu\text{l}$$

(Le contrôle étant la solution de 100µl de levures déposées)

On peut alors calculer un indice de phagocytose correspondant à :

$$\text{Indice de phagocytose} = \frac{\text{unité de fluorescence relative (RFU)}}{\text{concentration en protéines des hémocytes (par ml d'hémolymphe)}}$$

L'utilisation de l'une ou l'autre de ces techniques va dépendre de la disponibilité du matériel (cytomètre en flux, lecteur de microplaque) et de la quantité d'échantillons à traiter.

Le dosage des protéines s'effectue selon la méthode décrite par Lowry (Lowry, *et al.*, 1951).

III.A.3 Viabilité cellulaire

Ce test a tout d'abord été utilisé pour la viabilité (Babich & Borenfreund, 1993; Borenfreund & Babich, 1993), puis adapté pour évaluer la capacité d'endocytose (Gómez-Mendikute, *et al.*, 2002) et la stabilité lysosomiale (Lowe, *et al.*, 1995a).

Solutions

Solution stock : 20 mg de rouge neutre pour 1 mL d'eau distillée

Solution de travail : 2 µl de solution stock pour 1 mL de MIH (milieu d'incubation des hémocytes, utilisé pour l'évaluation de la capacité de phagocytose)

Solution de lyse : acide acétique 1%, éthanol 50% dans de l'eau distillée

Une solution stock de rouge neutre est mélangée à du MIH (2 mg/mL). Lorsque les hémocytes ont adhéré sur les parois de la microplaque (90 minutes), ils sont rincés avec du PBS et mis à incuber 3 h avec 100 µl de solution de travail de rouge neutre.

La solution de travail est alors délicatement aspirée, et les hémocytes sont rincés avec du MIH pour enlever le surplus de solution de rouge neutre. 100 µl de solution de lyse sont alors déposés dans chaque puits et laissés en incubation pendant 15 minutes à 4°C. On effectue une lecture différentielle au lecteur de microplaques à 540 nm et 690 nm en référence. Les valeurs sont alors rapportées en pourcentage de celles du témoin.

III.A.4 Reprotoxicité

III.A.4.1 Détermination des phosphoprotéines - VTG-like : dosage des phosphates labiles en milieu alcalin

La mesure de VTG plus spécifique par ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbant Assay*), est couramment utilisée chez le poisson (Hansen, *et al.*, 1998 ; Ostrander & Rotchell, 2003) car cette protéine est bien connue et les anticorps anti-VTG sont spécifiques. Or, chez les invertébrés, les anticorps ne sont pas disponibles car la protéine est différente (et n'est pas du tout caractérisée chez *C. fluminea*). Il a donc fallu donc effectuer un dosage indirect.

La vitellogénine (VTG), glycolipophosphoprotéine liant le calcium, est synthétisée par l'ensemble des vertébrés ovipares femelles au cours du cycle de reproduction. Produite au niveau du foie, elle est sécrétée dans la circulation sanguine et transportée jusqu'aux ovaires où elle s'accumule dans les ovocytes en croissance (vitellogenèse). Cette protéine est le précurseur des réserves vitellines de l'œuf nécessaire au développement du futur embryon. Chez les invertébrés, il existe une protéine s'y apparentant : la vitellogénine-like (Blaise, *et al.*, 1999). Chez la moule (*Mytilus edulis*), la protéine de la vitellogénine a récemment été clonée (Puinean & Rotchell, 2004). L'induction de cette protéine par le 17β -œstradiol, *via* les récepteurs œstrogéniques, (Figure 21 p.61) peut être évaluée en mesurant la concentration de résidus phosphates des protéines (Gagné & Blaise, 2000). La méthodologie (Figure 28) est basée sur le principe que la vitellogénine-like (VTG-like), complexe de lipophosphoprotéines, peut facilement être extraite par l'éther. Les phosphates se retrouvent alors dans la phase organique et sont libérés par une hydrolyse avec du NaOH. Les niveaux de phosphates libres dans la phase aqueuse de la solution de NaOH sont déterminés par le test au phosphomolybdate (Stanton, 1968). La concentration en phosphate est alors normalisée en fonction de la concentration en protéine de l'échantillon.

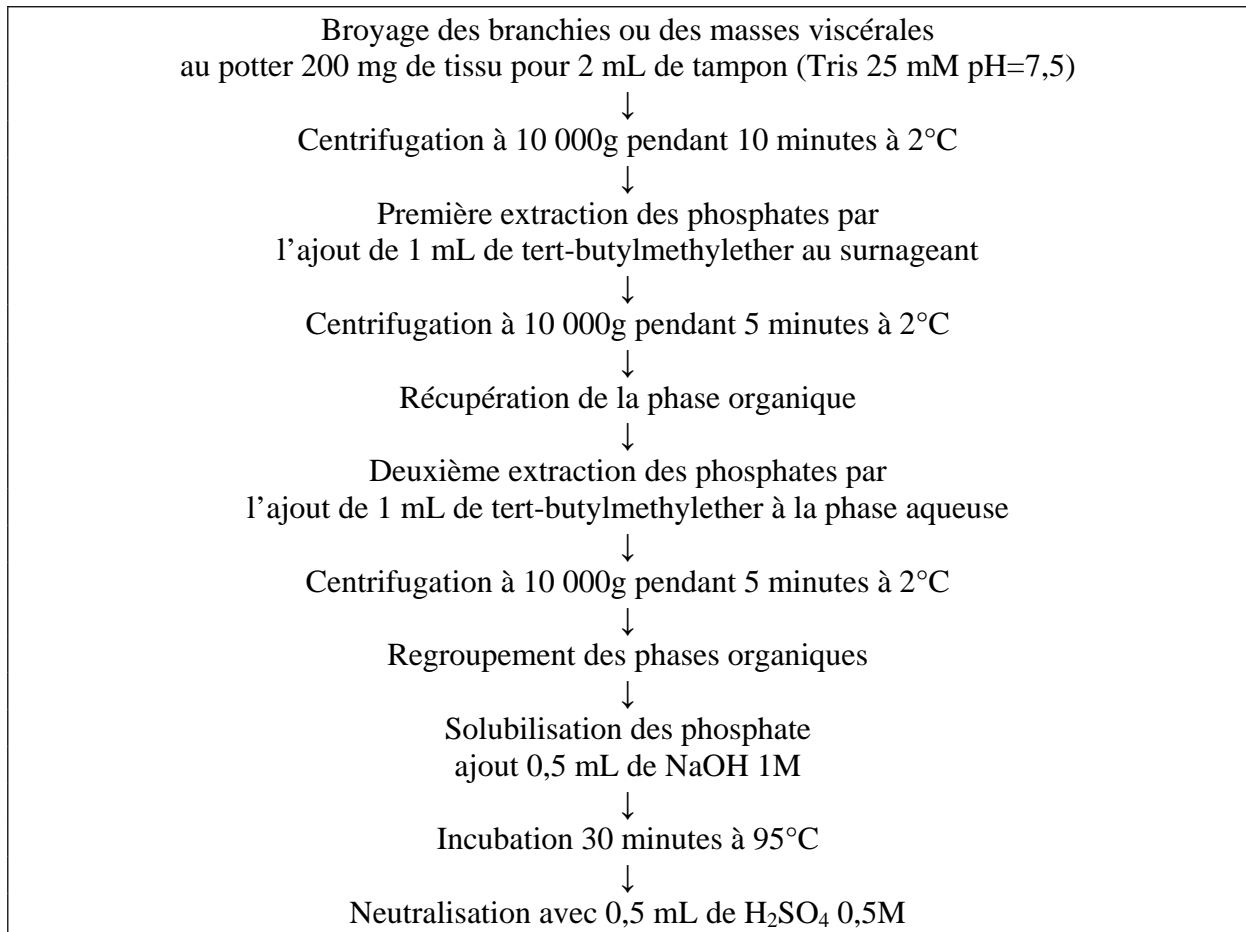


Figure 28 : Protocole d'extraction des phosphates labiles en milieu alcalin

Pour la révélation de la couleur, 0,2 mL acide ascorbique (10 g/100 mL) et 0,3 mL de solution de molybdate sont ajoutés à chaque échantillon.

La lecture se fait, après 10 minutes, au spectrophotomètre à 880nm

La quantité de phosphates présents est déterminée par une gamme de référence de phosphates et le dosage des protéines est effectué selon la méthode décrite par Lowry (Lowry, *et al.*, 1951).

III.A.4.2 Histologie des gonades

L'histologie des gonades a permis de montrer les effets sur les gonades de composés toxiques (Aarab, 2004). Les coupes et les colorations ont été effectuées au sein du Laboratoire de Biologie Cellulaire et d'Histologie de l'Université du Pays Basque à Bilbao (Pr. M.P. Cajaraville) à l'aide d'un automate de coloration (*histokinette*) permettant traiter simultanément un grand nombre d'échantillons.

L'histologie doit permettre la reconnaissance des différents tissus. Pour cela la coloration doit présenter des teintes suffisamment tranchées pour que les différents organes, ou partie d'un organe, apparaissent nettement dès les plus faibles grossissements du microscope. Plusieurs étapes sont nécessaires pour y arriver.

La **fixation** permet la conservation des structures. Le fragment tissulaire est immergé dans un liquide fixateur immédiatement après son prélèvement.

Pré-inclusion : Le fragment prélevé est inclus dans un composé hydrophobe. Il doit d'abord subir une déshydratation par immersion dans des bains d'alcool de degré croissant.

L'inclusion permet la réalisation de coupes fines et régulières. Le milieu d'inclusion utilisé est la paraffine. Elle est coulée dans un moule contenant le fragment d'échantillon. Après refroidissement, le bloc peut être découpé.

Les coupes d'une épaisseur de 4µm sont effectuées à l'aide d'un microtome. Le ruban obtenu lors de la coupe est récupéré puis déposé sur de l'eau maintenue à 40°C afin qu'il puisse se dérouler complètement et permettre sa récupération sur lame de verre.

Les colorations effectuées après déparaffinage des coupes (bains d'alcool de degré décroissant) utilisent deux types de colorants : l'hématoxyline et l'éosine. Elles sont réalisées sur des lames afin de permettre la mise en évidence des différentes structures.

L'utilisation d'une résine synthétique, dont l'indice de réfraction est voisin de celui du verre, permet la conservation des coupes.

III.A.5 Effets généraux

III.A.5.1 Réponses lysosomiales

Ces travaux ont été réalisés au Laboratoire de Biologie Cellulaire et d'Histologie de l'Université du Pays Basque à Bilbao (Pr. M.P. Cajaraville).

Préparation des tissus

Cette préparation est utilisée à la fois pour le test de stabilité lysosomiale et la mesure des changements structuraux des lysosomes.

Les masses viscérales de *C. fluminea* une fois disséquées (5 individus par condition expérimentale), sont plongées pendant 45 secondes dans du *n*-hexane refroidi à -70°C. Les tissus sont conservés à -80°C.

Les masses viscérales sont maintenues sur un portoir en aluminium avec du liquide d'enrobage *Jung's Tissue Freezing Medium* (Jung-Leica). Les coupes sont effectuées à l'aide d'un cryostat (MICROM HM 500M) à -20°C à une épaisseur de 8 µm pour les changements structuraux des lysosomes ou de 10 µm pour la stabilité lysosomiale. Les sections sont ensuite transférées sur des lames d'observation (Superfrost).

Les lames sont ensuite stockées à -40°C jusqu'à la coloration.

Avant de procéder aux colorations, les lames sont réchauffées graduellement 30 minutes au réfrigérateur à 4°C puis 10 minutes à température ambiante.

Lors de l'analyse des tissus sous microscope, il est important de bien différencier les tissus digestifs, des tissus reproducteurs (en particuliers les ovocytes) afin d'éviter les confusions ; les mesures s'effectuant dans les cellules de l'épithélium des tubules digestifs.

III.A.5.1.a Changements structuraux des lysosomes

Lors de l'exposition à des xénobiotiques, la structure et les fonctions des lysosomes vont être altérées soit par une surcharge des capacités de stockage des lysosomes (Sternlieb & Goldfisher, 1976) soit à cause des dommages causés par les espèces réactives de l'oxygène générées par les xénobiotiques (Winston, *et al.*, 1991). Ces altérations peuvent entraîner des diminutions significatives de la stabilité de la membrane, ou des augmentations de la taille des lysosomes (Cajaraville, *et al.*, 1989; Marigómez, *et al.*, 1989b; Etxeberria, *et al.*, 1994) (Tableau 6).

L'évaluation des changements structuraux des lysosomes requiert leur visualisation. Comme toute technique histochimique, une coloration est nécessaire. Le substrat que nous avons employé pour la coloration offre un excellent contraste entre les lysosomes et le cytoplasme des cellules, autorisant l'analyse d'image assistée par ordinateur pour la quantification. La méthode fait appel aux principes de la stéréologie.

Organisme	Polluant	Temps d'exposition (jours)	Variations des paramètres stéréologiques				Référence
			Vv	Sv	S/V	Nv	
<i>M. galloprovincialis</i> (ovocytes)	Ural WAF	21	→	→	↗	↗	(Cajaraville, <i>et al.</i> , 1991)
		21-49-91	→-↘-↘	→-↘-↗	↗-↘-↘	↗-↘-↘	(Cajaraville, <i>et al.</i> , 1995a)
<i>M. galloprovincialis</i>	Maya WAF	21	→	→	↗	→	(Cajaraville, <i>et al.</i> , 1991)
		21-49-91	↗-→-↗	↘-→-↗	↗-↘-↘	→-↘-→	(Cajaraville, <i>et al.</i> , 1995a)
<i>M. galloprovincialis</i>	Lubrifiant	21	↗ns	↗	↗ns	↗	(Cajaraville, <i>et al.</i> , 1991)
		21-49-91	↘	↘-↗-↘	↗-→-↗	↘-↗-↘	(Cajaraville, <i>et al.</i> , 1995a)
<i>M. galloprovincialis</i> (cellules digestives)	Cuivre	6-20-27-41	↗	↗	↘	↗	(Etxeberria, <i>et al.</i> , 1994)
	Cadmium	6	↗	↗	↘	→	
		20-27-41	↗	↗	↘	↗	
	Zinc	6-27-41	↗	↗	↘	↗	
		20	↗	↗	→	↗	
<i>M. edulis</i>	Pétrole brut Mer du Nord	103	↗	↗	↘ns	↘	(Lowe, <i>et al.</i> , 1981)
<i>L. littorea</i>	1-naphtol	4	↗	→	↘	→	(Cajaraville, <i>et al.</i> , 1989)
<i>L. littorea</i>	Cadmium	4-12-20-28	→	↘	→-↘-↘-↘	↘-↘-↘-↘	(Marigómez, <i>et al.</i> , 1989a)
<i>M. galloprovincialis</i>	DEHP Inj.	1-7	→ - ↗	→ - ↗	→ - →	→ - →	(Marigómez & Baybay-Villacorta, 2003)
	DEHP exp.	1-7-21	↗ - ↗ - ↗	↗ - ↗ - ↗	→ - ↘ - →	→ - ↗ - →	
	WAF Inj.	1-7	↗ - →	↗ - →	→ - →	↗ - →	
	WAF exp.	1-7-21	→ - ↘ - →	→ - ↗ - ↗	→ - ↗ - →	→ - → - ↗	
	BaP inj.	1-7	↗ - →	→ - →	↘ - →	↗ - →	
	BaP exp.	1-7-21	→ - ↗ - →	→ - ↗ - →	↘ - → - →	↘ - ↗ - ↘	
	Acétone inj.	1-7	→ - →	→ - →	→ - →	→ - →	
Acétone exp.	1-7-21	→ - ↘ - ↘	→ - ↘ - ↘	→ - ↘ - →	→ - → - ↘		
<i>Dreissena polymorpha</i>	Cadmium	7-21	↗ - ↗	↗ - ↗	↘ - →	↗ - ↗	(Giamberini & Cajaraville, 2005)

Tableau 6 : Variations des paramètres stéréologiques lysosomiaux chez diverses espèces de bivalves avec l'augmentation de la concentration du polluant considéré.

Les flèches indiquent une augmentation, diminution ou pas de changement des paramètres (ns : non significatif) de la densité volumique (Vv), surfacique (Sv), de la taille (S/V) et du nombre (Nv) des lysosomes.

La stéréologie

Le terme de stéréologie a été utilisé pour la première fois en 1962 lors du premier meeting de la Société Internationale de Stéréologie (the International Stereological Society, ISS). Cette science est la partie des mathématiques qui s'attache à quantifier des structures tri-dimensionnelles (3-D) (nombre, taille, volume) à partir de données quantitatives issues de coupes bi-dimensionnelles (2-D) (Baddeley, 1993).

Il existe une classification simple des conventions de notation et des classifications concernant les paramètres stéréologiques les plus couramment utilisées :

- les données primaires ou paramètres 2-D : obtenues sur des coupes et classiquement estimées en stéréologie par superposition de grilles transparentes sur l'image ou d'autres types de sondes (estimation du nombre, des surfaces, des longueurs des objets d'intérêt)
- les données intermédiaires ou densités 2-D des profils sur coupes: densité surfacique 2-D ou densité numérique 2-D. En général, la mesure effectuée au niveau précédent est divisée par une surface ou une longueur de référence.
- les données secondaires ou densités de structure 3-D: densité volumique, densité numérique 3-D,... (par unité de volume),
- les données tertiaires ou paramètres de structure 3-D: volume moyen d'un type de structure, nombre d'objets dans un espace de référence,...

Les données secondaires permettent de comparer des concentrations morphologiques du composant à quantifier, alors que les données tertiaires sont plus satisfaisantes pour étudier ces objets dans un espace de référence donné, car celui-ci peut varier de taille (Mayhew & White, 1980; Bolender, 1992). Par exemple, dans notre cas, le volume des organites étudiés peut varier en fonction de la condition expérimentale.

Pour les règles de base concernant la notation des paramètres stéréologiques, l'espace de référence majeur est le cytoplasme de la cellule digestive.

Cette approche relève de la stéréologie classique que l'on oppose aux méthodes « assumption-free » ou « design-based » qui ne requièrent aucune supposition sur la forme ou la distribution de taille des objets. Ces méthodes sont toutes plus ou moins dérivées d'un principe de quantification nommé *Disector* apparu en 1984 (Sterio, 1984) basé sur le comptage des objets d'intérêt sur des coupes sériées. Ainsi, les estimateurs de la densité numérique et du nombre d'objets sont non biaisés et indépendants de la forme de ces objets. Diverses méthodes dérivées de cette technique ont été publiées par la suite (Cruz-Orive, 1987; Gundersen, 1988; Gundersen, *et al.*, 1988; Pakkenberg & Gundersen, 1988).

Une surestimation peut être due à des problèmes systématiques ou de biais d'observations. Par exemple une incapacité à séparer le dessus du dessous d'une surface peut mener à une surestimation du volume (effet de Holmes). Ainsi, une image observée sous microscope possède une certaine profondeur, en relation avec l'épaisseur de la coupe. Si on considère un objet inclus dans une matrice (Figure 29), l'épaisseur des coupes (t) influe sur la quantification des particules (autant en terme de volume que de nombre) ; il peut y avoir confusion entre une particule sectionnée et une particule entière se trouvant sur un autre plan. Lorsque l'épaisseur de la coupe est inférieure à la taille des particules, cela réduit les difficultés.

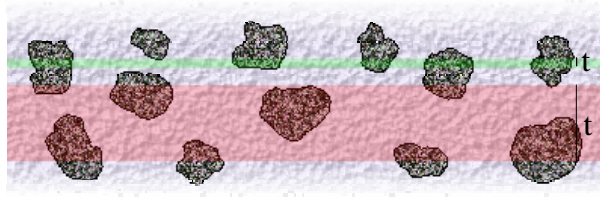


Figure 29 : Epaisseur de coupes dans une matrice avec des particules incluses

Un facteur de correction peut être introduit dans les équations pour éviter l'effet de Holmes dû à l'épaisseur des coupes (t) (Weibel, 1979; Bondok & Sansone, 1984). En règle générale, l'effet de Holmes peut être ignoré si la taille de l'objet à dénombrer est nettement supérieure à t (Weibel, *et al.*, 1969; Weibel, 1979).

Le programme d'analyse d'image utilisé dans ces travaux va calculer 4 paramètres stéréologiques :

➤ Densité volumique - Principe de Delesse (1847) (Weibel, 1979)

Ce principe précise que la densité volumique (V_v) de divers composants d'un solide peut être estimée par des mesures, sur des sections aléatoires, des aires relatives (ou densité surfacique) de leur profil (Briarty, 1975) et que le rapport entre l'aire occupée par un composant et l'aire du profil est une estimation de la fraction de volume du composant dans l'objet. Ce principe peut s'exprimer sous la forme :

$$V_v = \frac{(\sum a).t}{(\sum A).t} = A_A$$

Dans notre cas, la densité volumique lysosomiale (V_v) est le rapport entre le volume occupé par les lysosomes (V_L) et le volume du cytoplasme (V_C) des cellules digestives qui les contiennent :

$$V_{v(L,C)} = A_{A(L,C)} = A_L/A_C$$

$$V_v = V_{LC} = V_L/V_C$$

Unités : $V_v = \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3 = \mu\text{m}$ (peut également s'exprimer en %)

(avec : A : aire, V : volume, C : cytoplasme, L : lysosome, t : épaisseur de la coupe)

➤ Densité surfacique (2-D)

La densité surfacique correspond à la surface d'échange du lysosome avec le cytoplasme.

La densité surfacique lysosomiale (S_v) est le rapport entre la surface occupée par les lysosomes (S_L) et le volume du cytoplasme (V_C) des cellules digestives qui les contiennent.

$$S_v = S_{vL} = S_L/V_C$$

Unités : $S_L/V_C = \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3 = \mu\text{m}^{-1}$

(avec : S : surface, V : volume, C : cytoplasme, L : lysosome, t : épaisseur de la coupe)

➤ Rapport surface/volume

Le rapport surface/volume (S/V) est le rapport entre la surface (S_L) et le volume (V_L) occupés par les lysosomes.

$$S/V = S_L/V_L$$

Unités : $S_L/V_L \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3 = \mu\text{m}^{-1}$

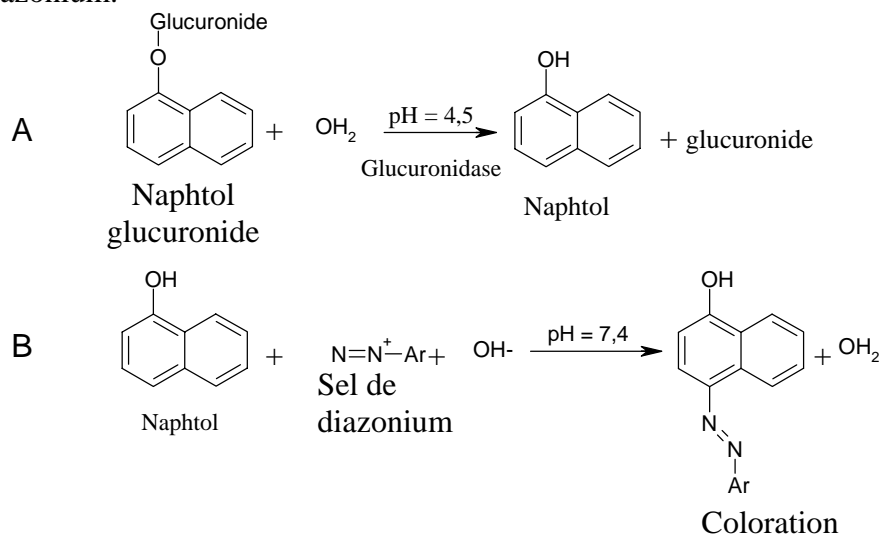
➤ Densité numérique (3-D)

La densité numérique lysosomiale (N_v) est le rapport entre le nombre de lysosomes (N_L) et le volume du cytoplasme (V_C) les cellules qui les contiennent :

$$N_v = N_L/V_C$$

L'évaluation des changements structuraux des lysosomes est une procédure histochimique de détermination de l'activité de la β -glucuronidase lysosomiale. Cette coloration permet d'obtenir un contraste suffisant lors d'une analyse d'image en noir et blanc, entre les lysosomes et le reste de la cellule.

Cette méthode s'effectue en deux étapes. La première (A) est la réaction hydrolytique du naphтол glucuronide et la seconde (B) est une réaction de couplage qui fait précipiter le naphтол en présence de sel de diazonium.



Analyse d'image

Pour la quantification de la structure des lysosomes de la glande digestive, les analyses d'images ont été réalisées avec le logiciel *Biological Measurement System*[®] (Sevisan[™], Espagne) au Laboratoire de Biologie Cellulaire et d'Histologie du Pr. M.P. Cajaraville. L'objectif utilisé permet un grossissement $\times 1000$. Cinq mesures par section sont effectuées afin de calculer les 4 paramètres stéréologiques (Lowe, D.M., *et al.*, 1981) décrits précédemment :

Densité volumique lysosomiale (V_v) : rapport entre le volume lysosomal et le volume du cytoplasme de la cellule digestive : $V_v = V_{vL} = V_L / V_C$

Densité surfacique lysosomiale (S_v) : rapport entre la surface lysosomiale et le volume du cytoplasme de la cellule digestive : $S_v = S_{vL} = S_L / V_C$

Rpport Surface / Volume (V_v / S_v) : ce paramètre peut être considéré comme étant l'inverse de la taille des lysosomes ; plus ce rapport est petit plus la taille des lysosomes est grande : $S / V = S_{vL} = S_L / V_L$

Densité numérique lysosomiale (N_v) : rapport entre le nombre de lysosomes et le volume du cytoplasme de la cellule digestive : $N_v = N_{vL} = N_L / V_C$

Comme on peut l'observer dans le Tableau 6, de manière générale, sous des conditions de stress, les lysosomes deviennent plus larges (reflété par une augmentation de V_v et S_v , en parallèle à une augmentation de S/V). Dans certains cas, l'élargissement des lysosomes est accompagné par une augmentation de leur nombre (N_v) dans le cytoplasme, alors que dans d'autres cas, il s'agit d'une diminution du nombre.

III.A.5.1.b Stabilité lysosomiale

Ce protocole (UNEP/RAMOGGE, 1999) est une procédure cytochimique permettant de déterminer la stabilité membranaire lysosomiale. Elle est basée sur l'évaluation de l'activité de la N-acétyl- β -hexosaminidase (ou de la phosphatase acide), enzyme lysosomiale. La déstabilisation de la

membrane des lysosomes est mesurée par l'augmentation de sa perméabilité au substrat (naphtol AS-BI N-acétyl- β -glucosaminide) qui va réagir avec un enzyme à l'intérieur des lysosomes (hexosaminidase ou phosphatase acide) en présence d'un sel de diazonium.

Différents temps de déstabilisation ont été testés : 0, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 et 90 minutes

Interprétation des résultats

Les lames sont observées sous microscope. Les lysosomes ont une couleur rouge-mauve due à la réactivité du substrat avec la N-acétyl- β -hexosaminidase. Le temps de déstabilisation de la membrane lysosomiale (LP) pour chaque section correspond à la moyenne des temps d'incubation dans le tampon acide qui produit la réactivité de coloration maximale.

Les LP des échantillons des diverses conditions expérimentales sont ensuite comparés aux témoins afin de déterminer un gradient dans la toxicité. Une réduction des valeurs de LP le long d'un gradient de contamination attendu indique un stress cellulaire dû aux effets des contaminants sur les lysosomes.

III.A.5.2 Les indices de condition

L'indice de condition est le rapport du poids de chair sur le volume interne de la coquille, et représente le premier indicateur du taux de remplissage de la coquille par les tissus mous. Cet indice est généralement utilisé pour évaluer les variations saisonnières des réserves nutritives ou de la qualité des tissus, aussi bien que pour suivre les effets délétères de divers contaminants et/ou maladies (Crosby & Gale, 1990) et est recommandé dans l'industrie d'élevage des moules (Hickman & Illingworth, 1980) :

$$IC = \frac{\text{poids des tissus mous (g.)}}{\text{poids total (g.)} - \text{poids coquille (g.)}} \times 100$$

Si ce calcul renseigne peu sur l'état physiologique global de l'animal, il permet par contre de quantifier de manière fiable tout changement de poids des individus et de comparer des échantillons entre eux ou de suivre leur évolution dans le temps.

Nous avons utilisé cet indice pour effectuer les comparaisons entre les différentes conditions d'exposition, mais il existe d'autres méthodes pour calculer les indices de condition :

Ce calcul est dérivé de méthodes déjà utilisées auparavant (Baird, 1958; Hickman & Illingworth, 1980) :

$$IC = \frac{\text{volume du corps mou (ml.)}}{\text{volume de la cavité de la coquille (ml.)}} \times 100$$

où le volume de la cavité de la coquille étant représenté par le volume de l'animal vivant, moins le volume de la coquille. Cet indice de condition, pour les poids frais, peut être adapté pour les poids secs, en remplaçant le volume du corps mou par le poids sec du corps mou.

Il existe également un autre indice recommandé par l'Association Française pour la Standardisation (AFNOR, Norme Française NF V45056, septembre 1985), calculé de la façon suivante:

$$IC = \frac{\text{poids du corps mou (g.)}}{\text{taille (cm.)}}$$

dont une variante est donnée pour les poids secs (Mäkelä & Oikari, 1995) :

$$IC = \frac{\text{poids sec du corps mou (g.)}}{\text{taille (cm.)}}$$

Un autre indice utilisant la taille de moules a aussi été utilisé pour pallier les erreurs induites par les fluctuations de tailles moyennes (Amiard, *et al.*, 1998; Romeo, *et al.*, 2003). Ils sont calculés de la façon suivante:

$$IC = \frac{\text{poids du corps mou (g.)}}{\text{poids total (g.)}} \times 100$$

D'autres études ont préféré utiliser les matériaux secs de la dreissène et de la moule bleue (Walne & Mann, 1975; Mersch, *et al.*, 1996; Mersch & Beauvais, 1997; Nesto, *et al.*, 2004) :

$$IC = \frac{\text{poids sec du corps mou (mg.)}}{\text{poids sec de la coquille (g.)}}$$

avec l'équivalent pour les poids frais (Mann & Glomb, 1978; Duquesne, *et al.*, 2004) :

$$IC = \frac{\text{poids corps mou (g.)}}{\text{poids de la coquille (g.)}}$$

L'indice de condition est relevé sur 15 animaux par condition expérimentale.

III.B Conditions expérimentales

Ces travaux font partie intégrante d'une plus vaste étude menée en mésocosme.

Une étude des différents marqueurs sélectionnés a d'abord été réalisée en laboratoire afin d'optimiser les conditions d'utilisation et permettre leur développement afin de pouvoir ensuite les appliquer et les valider en conditions semi-contrôlées (mésocomes).

Collecte des animaux

Pour toutes les expérimentations, les individus de *C. fluminea* ont été prélevés dans le lac de Cazaux-Sanguinet (sauf pour l'expérimentation n°1 où les animaux ont été prélevés dans l'Isle au lieu-dit Bénévent en Dordogne). Ce lac est connu pour la très bonne qualité de ses eaux, les dosages de HAP, PCB, pesticides et métaux ont confirmé un très faible niveau de contamination (données DIREN).

III.B.1 Développement en conditions contrôlées

III.B.1.1 Expérimentation n°1 préliminaire – exposition *in vitro* d'hémocytes de *C. fluminea* au cadmium

Cette expérimentation est une étape préliminaire avant les expérimentations en aquariums pour l'application du test de l'activité de phagocytose des hémocytes.

Les matériels et méthodes de cette expérimentation sont reportés dans l'article 1.

Les hémocytes, une fois retirés des individus, sont exposés *in vitro* à des concentrations croissantes de cadmium (CdCl_2) : 0,5, 1, 10, 50, 100, 200, 300, 500, 1000, 1500 et 2000 μM pendant 24 heures à 20°C. L'activité de phagocytose (technique employant les levures) des hémocytes est mesurée en parallèle à l'observation des atteintes du cytosquelette (filaments d'actines et microtubules) en immuno-histochimie.

III.B.1.2 Expérimentation n°2 – exposition de *C. fluminea* au cadmium

Les matériels et méthodes de cette expérimentation sont reportés dans l'article 2.

Les animaux sont mis en stabulation 8 jours avant le début des expérimentations dans des aquariums de 20 L. avec de l'eau aérée et déchlorée.

Ils ont ensuite été transférés dans des aquariums, saturés 1 semaine auparavant au cadmium, afin de minimiser les phénomènes d'adsorption sur les parois.

Les animaux sont exposés à des concentrations croissantes de cadmium 0, 3, 10, 21,5, 46,4 et 100 $\mu\text{g/L}$ pendant 30 jours et sont prélevés après 7, 15 et 30 jours d'exposition pour la mesure des différents paramètres.

L'eau des aquariums est renouvelée tous les 2 jours afin de garder une concentration de cadmium constante dans les aquariums.

Mesure des marqueurs

En **génotoxicité**, les taux d'oxydation de l'ADN ont été évalués par la quantification des taux de 8-oxodG par rapport à la base normale. Les taux de désassemblage de l'ADN ont été estimés avec le test du *DNA unwinding*.

En **immunotoxicité**, l'activité de phagocytose des hémocytes a été déterminée avec la technique utilisant des microbilles en latex (cytomètre en flux). Les mesures ont été effectuées sur 6 animaux (4 mesures par animal) pour chaque condition expérimentale. Une comparaison de l'activité de phagocytose avec les deux techniques (avec microbilles et avec levures) a été réalisée pour le dernier temps de prélèvement (30 jours).

L'évaluation des paramètres **généraux de stress** a été effectuée par la mesure de la réponse des lysosomes avec les tests de stabilité lysosomiale (avec l'hexosaminidase et la phosphatase acide) et de changements structuraux des lysosomes.

III.B.1.3 Expérimentation n°3 – exposition de *C. fluminea* au tributyl-étain et au 17 β -œstradiol

Les matériels et méthodes de cette expérimentation sont reportés dans l'article 3.

Pour avoir un contrôle sur l'ensemble des contaminations, l'eau utilisée est de l'eau ISO (ISO 7346 pour *Brachydanio rerio*). Les animaux sont mis en stabulation dans l'eau ISO pendant 48 h. avant l'exposition à trois concentrations de TBT (50, 250 et 500 ng/L) et à trois concentrations de 17 β -œstradiol (20, 200, 2000 ng/L) pendant 30 jours. L'eau des aquariums est changée quotidiennement et les différentes concentrations de TBT et de 17 β -œstradiol sont injectées avec la même quantité de solvant porteur (méthanol). Les animaux sont prélevés après 7, 15 et 30 jours d'exposition pour la mesure des paramètres.

Mesure des marqueurs

En **immunotoxicité**, l'activité de phagocytose des hémocytes a été déterminée avec la technique utilisant les levures. Les mesures ont été effectuées sur 6 animaux (avec 4 mesures par animal) pour chaque condition expérimentale.

En **reprotoxicité**, la formation de VTG-like a été évaluée avec le dosage des phosphates labiles en milieu alcalin. Et les possibles modifications sur les gonades dues au TBT et au 17 β -œstradiol ont été appréciées par des coupes histologiques.

L'évaluation des paramètres **généraux de stress** a été effectuée par la mesure des changements structuraux des lysosomes

III.B.2 Application et validation en conditions semi-contrôlées (mésocosmes)

III.B.2.1 Acclimatation des animaux

Après leur collecte, les animaux sont transportés dans des bidons de 60L remplis d'eau du lac aérée jusqu'aux mésocosmes (Rivières Pilotes) (Figure 30). Les animaux sont ensuite transférés dans des poches ostréicoles (maille de 8 mm.) et mis en stabulation en contact avec l'eau du Gave de Pau dans l'ouvrage de distribution 1 mois avant le début des expositions aux divers produits.

III.B.2.2 Système d'exposition

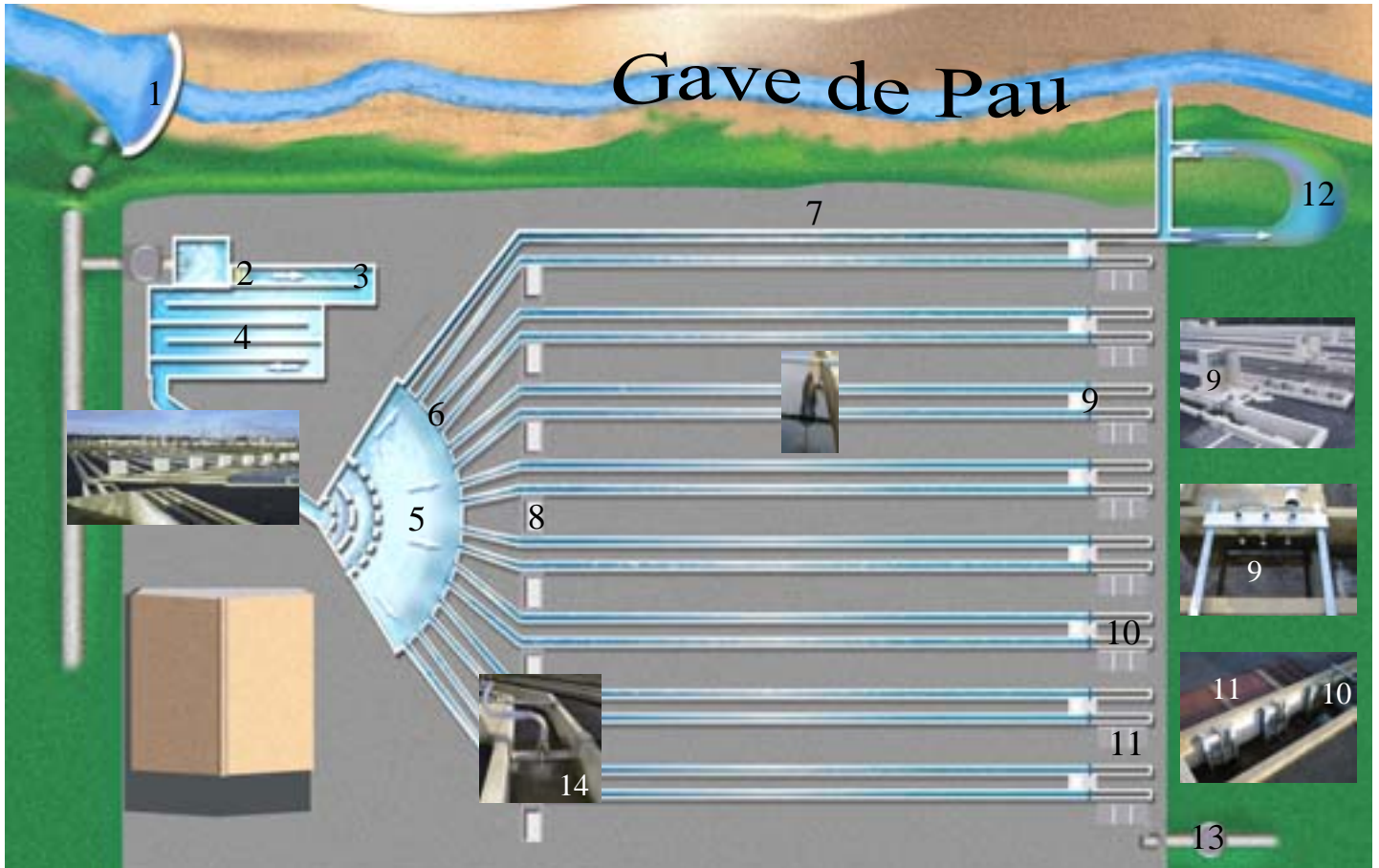
Les Rivières Pilotes sont une série de 16 mésocosmes dynamiques parallèles ouverts (Figure 30), alimentés en eau douce, à Lacq (Pyrénées Atlantiques). Ces mésocosmes sont exposés aux conditions naturelles.

L'eau provient d'une dérivation provenant d'un barrage sur le Gave de Pau permettant d'alimenter (200 m³/h) ces mésocosmes par gravité. L'eau est estimée être de bonne qualité en accord avec les critères de l'Agence de l'Eau. Elle n'est ni filtrée, ni traitée. Ceci permet une colonisation des 16 canaux. Chaque canal (mésocosme) mesure 40 mètres, 50 cm de large et de profondeur. Pour nos expérimentations, le volume spécifique de chaque canal est de 4 m³. Le courant atteint la vitesse de 10 cm/s. Le temps de résidence des substances dans un canal est de 10 minutes.

Une pépinière est installée en amont des 16 mésocosmes et constitue une réserve d'organismes vivants favorisant la colonisation des canaux. L'eau est parfaitement distribuée dans les 16 canaux par des déversoirs installés à la même hauteur, de façon à maintenir un débit identique dans chaque canal.

Les substances à étudier sont délivrées par des pompes situées dans des cabinets en amont des canaux. En fonction de la nature des produits injectés, ces pompes peuvent être simples pour les produits facilement hydrosolubles ou à cisaillement. Les pompes à cisaillement permettent l'injection des produits faiblement hydrosolubles à liposolubles sous forme de micro-gouttes afin de ne pas faire intervenir de solvants porteurs. Le diamètre des filtres à cisaillement a été déterminé afin que les micro-gouttes aient un temps de résidence maximal dans les canaux.

Les paramètres physico-chimiques (pH, O₂, température) sont mesurés automatiquement en fin de canal par des sondes. L'eau peut être évacuée de 3 façons différentes : directement dans la rivière, vers une lagune à macrophytes ou vers la station d'épuration de l'usine de Lacq en fonction des produits utilisés.



- | | | | |
|---|-----------------------------------|----|---------------------------------------|
| 1 | Barrage | 8 | Coffrets : pompes |
| 2 | Compteur d'eau | 9 | Coffrets : capteurs physico-chimiques |
| 3 | Régulation du débit | 10 | Déversoirs avals |
| 4 | Pépinière d'organismes aquatiques | 11 | Rejets |
| 5 | Ouvrage de distribution | 12 | Lagune à Macrophytes |
| 6 | Déversoirs | 13 | Rejet vers station d'épuration |
| 7 | 16 Canaux expérimentaux | 14 | Vanne à cisaillement |

Figure 30 : Schéma des rivières artificielles (Rivières Pilotes, Lacq (64), TOTAL)

III.B.2.3 Contrôle des paramètres physico-chimiques et des contaminations

La température, le pH, l'oxygène dissous, la conductivité et le débit sont mesurés en continu (toutes les 15 minutes) par des capteurs immergés en permanence, localisés en fin de canal :

- température : intégrée dans les sondes pH et O₂,
- pH : capteurs et sondes Fisher et Rosemount, sonde pH, modèle 399, à électrode de verre,
- oxygène dissous : capteur et sondes Fisher et Rosemount, sonde O₂ ampérométrique 499 A DO, cathode en or et anode en argent,
- conductivité : capteurs et sonde Fisher et Rosemount, sonde à immersion/insertion.

Les mesures des paramètres chimiques : DCO, DBO₅, NH₄, NO₃, PO₄, Pt (Laboratoire département agréé COFRAC) sont effectuées ponctuellement avant l'exposition, après 7 jours (T7), 15 jours (T15) et 30 jours d'exposition (T30) (données TOTAL).

III.B.2.4 Exposition

Les expositions durent 30 jours et des prélèvements sont effectués après 7 jours, 15 jours et 30 jours d'exposition. Pour chaque condition, 50 animaux sont immergés dans des enclos verticaux ($\frac{1}{3}$ de poche ostréicole, maille de 8 mm.) suspendus au centre du canal, parallèlement au courant. Les enclos sont placés à une distance comprise entre 20 et 40 mètres du point d'injection ; distance à laquelle la substance testée est parfaitement homogénéisée dans l'eau.

Pour les substances solubles dans l'eau, une injection directe à l'amont du canal a été effectuée grâce à des pompes doseuses à membrane (Prominent Gamma), à partir des solutions mères. Pour les substances liquides non solubles dans l'eau, l'utilisation d'une vanne à cisaillement permet d'obtenir une émulsion mécanique stable.

Deux types d'expérimentation ont été menés dans les Rivières Pilotes.

III.B.2.5 Expérimentation n°4 – exposition au méthacrylate de méthyle

III.B.2.5.a Contaminations

Les concentrations en méthacrylate de méthyle (Tableau 7) ont été déterminées à partir de la NOEC daphnies (37 mg/L), elle-même déterminée sur une durée d'exposition de 21 jours (Springborn Laboratories Inc. (SLI), 1997). La PNEC (0,74 mg/L) est calculée avec un facteur de sécurité de 50 (Intitute for Health and Consumer Protection, 2002).

Concentrations (mg/L)		Canal
0,74	PNEC	1
148	4 NOEC	2
0	Témoin	4
22	30 PNEC	7
0,74	PNEC	8
0	Témoin	10
37	NOEC	11
7	10 PNEC	13
22	30 PNEC	15
0	Témoin	16

Tableau 7 : Concentrations du MAM dans les canaux

Le méthacrylate de méthyle a été injecté à l'aide de vannes à cisaillement malgré sa solubilité (16 g/L à 20°C). En effet, des problèmes ont été détectés (remontée du produit en surface) lors de tests préliminaires.

Les concentrations de méthacrylate de méthyle dans l'eau sont mesurées par un couplage "HEAD SPACE"/GC/FID avec une limite de détection de 0,3 mg/L.

III.B.2.5.b Mesures des biomarqueurs

Pour chaque condition, la mortalité est relevée et les animaux survivants sont répartis en différents lots pour le dosage des biomarqueurs : changements structuraux des lysosomes, activité de la phagocytose et 8-oxodG. Toutes les dissections sont effectuées sur de la glace.

En **immunotoxicité**, la méthode choisie pour évaluer la phagocytose est celle utilisant les levures marquées à la fluorescéine isothiocyanate (FITC). Cette méthode a fait l'objet d'une adaptation au préparateur automatique d'échantillons (Quadra 96 modèle 320 - TOMTEC) pour une intervention sur un grand nombre d'échantillons. Pour chaque condition, nous avons récupéré les hémocytes de 6 individus et réalisé 3 mesures d'activité de phagocytose par individu. La viabilité cellulaire a également été mesurée.

L'**état général** est évalué par la mesure des changements structuraux des lysosomes. Les masses viscérales de 5 individus par condition sont prélevées pour mesurer ces changements.

En **génotoxicité**, au moins 3 pools de 3 branchies par condition ont été réalisés.

Toutes les dissections sont effectuées sur de la glace et les organes prélevés sont congelés dans de l'azote liquide, puis stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Pour cette expérimentation où les animaux sont dans un milieu « naturel », un indice de condition a été également mesuré.

III.B.2.6 Expérimentation n°5 – exposition à des produits purs et en mélanges

III.B.2.6.a Contaminations

Quatre produits de nature différente ont été choisis pour ces expérimentations :

- un métal lourd : CdCl₂ (Interchim, Montluçon, France)
- un pesticide organophosphoré : le méthylbladan[®] (formulation à 40% de méthylparathion dans du xylène, Bayer)
- un mélange d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (huile anthracénique): coupe claire de goudron de houille (Chemco, Poissy, France)
- un acide : l'acide monochloracétique écaillé (Atofina n°CAS 79-11-8)

Les concentrations de chaque produit pur utilisé au cours de cette expérimentation ont été préalablement déterminées grâce à des tests écotoxicologiques effectués en laboratoire (Microtox, tests daphnies et micro algues). A l'issue de la première phase d'exposition (produits purs), seules les doses induisant le premier effet significatif observé sur l'écosystème (LOEC) ont été sélectionnées (Tableau 8).

	CdCl ₂ (Cd)	Huile anthracénique (HA)	Méthyl parathion (MB)	Acide monochloracétique (AMCA)
Concentration (µg/L)	5	80	4	1250

Tableau 8 : Concentrations appliquées lors des expérimentations sur les interactions

Le plan de mélange (conçu par la société KSCI : χ^2 Statistique Industrielle Consulting) est organisé selon un réseau de Scheffé permettant des comparaisons multiples. Les produits seront testés seuls, en mélanges binaires et en mélanges ternaires. Il y aura donc 14 combinaisons et 2 témoins (Tableau 9) :

Produits	Canal
HA/AMCA/Cd	1
HA/MB	2
MB/Cd/AMCA	3
HA/AMCA	4
AMCA	5
MB/Cd	6
AMCA/MB	7
HA	8
Cd	9
Témoin 1	10
Cd/HA	11
MB	12
HA/MB/Cd	13
AMCA/Cd	14
AMCA/MB/HA	15
Témoin 2	16

Tableau 9 : Plan des mélanges : organisation des contaminants dans les canaux

Les analyses des produits dans l'eau ont été réalisées spécifiquement, aux mêmes temps de prélèvement que les animaux (données TOTAL) :

- cadmium : spectrométrie d'émission à plasma ICPMS (Varian Spectra II) (limite de détection = 1 µg/L)
- huile anthracénique : HPLC (limite de détection = 5 µg/L)
- méthyl paration : HPLC à détection UV (limite de détection = 0,1 µg/L)
- acide monochloracétique : méthode EPA 552.2 (limite de détection = 25 µg/L)

Des animaux sont maintenus en place pendant 7 jours après la fin de la contamination afin d'évaluer leur capacité de récupération.

III.B.2.6.b Mesures des biomarqueurs

Pour chaque condition, la mortalité est relevée et les animaux survivants sont répartis en différents lots pour le dosage des biomarqueurs : indice de condition, changements structuraux des lysosomes, activité de la phagocytose et 8-oxodG. Toutes les dissections sont effectuées sur de la glace.

Mortalité

La mortalité a été relevée pour chaque condition. Pour les expositions aux mélanges binaires, nous avons utilisé la formule de Abbott (Levy, *et al.*, 1986) qui permet de déterminer les interactions entre produits sur la mortalité. Cette formule donne une mortalité théorique pour un mélange ab en fonction des mortalités observées pour les produits seuls a et b.

$$M_{th}=a+b-ab$$

Le rapport de la mortalité théorique (M_{th}) sur la mortalité observée (M_{obs}) nous donne un facteur d'interaction (FI) qui nous permet de déterminer le type d'interaction :

$$FI=M_{obs}/M_{th}$$

FI<1 : antagonisme, FI=1 : additivité, FI>1 : synergie

Activité de phagocytose des hémocytes

Pour chaque condition, l'hémolymphe est prélevée sur 6 animaux, puis répartie dans les puits d'une microplaque en polystyrène de 96 puits (3 mesures par animal). La méthode de mesure utilisée est celle qui utilise le cytomètre en flux. Bien que le traitement des résultats soit plus long, cette méthode permet le stockage des échantillons, nécessaire dans cette expérimentation.

Réponse des lysosomes - changements structuraux des lysosomes

Pour ce test, 5 masses viscérales sont prélevées par condition expérimentale.

8-oxodG

Les branchies de 9 animaux sont prélevées et réparties en 3 lots de 3 paires de branchies. Ces lots sont ensuite congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

III.B.3 Statistiques

Après avoir vérifié l'homogénéité des variances, les différences entre les groupes sont estimées en effectuant une ANOVA, le test de Tukey a été employé pour comparer les données recueillies pour les différentes concentrations.

Pour les paramètres stéréologiques des changements structuraux des lysosomes, le test multiparamétrique de Duncan a été utilisé. Les valeurs obtenues pour la densité volumique lysosomiale (V_v) et la densité numérique lysosomiale (N_v) ont été transformées en logarithme avant le traitement statistique pour obtenir une distribution normale.

Résultats - Discussion

IV Résultats - discussion

IV.A Développement en conditions contrôlées

Dans cette partie, les expériences effectuées en conditions contrôlées nous ont permis d'adapter les différents biomarqueurs d'effets choisis chez *C. fluminea* et de sélectionner ceux pouvant être le mieux appliqués lors d'études sur le terrain.

Rappels des biomarqueurs sélectionnés pour le développement et l'application chez *C. fluminea* :

- génotoxicité : bases oxydées (8-oxodG), *DNA unwinding*
- immunotoxicité : activité de phagocytose des hémocytes
- reprotoxicité : quantification de la vitellogénine et coupes histologiques des gonades
- marqueurs généraux : réponses lysosomiales, indices de condition et mortalité.

Ces mises au point et sélections sont effectuées à travers diverses expositions, *in vitro* et en aquariums, avec un contaminant type, le cadmium, dont les effets sont connus en raison de son utilisation fréquente lors des tests en écotoxicologie.

IV.A.1 Expérimentation préliminaire : exposition *in vitro*

La mesure de l'activité de la phagocytose est un test très largement appliqué en routine sur divers organismes tels que les gastéropodes (Prowse & Tait, 1969 ; van der Knaap, *et al.*, 1987), les bivalves (Hansen, 1992; Pipe, *et al.*, 1995; Mortensen & Glette, 1996; Dyrinda, *et al.*, 1998; Auffret, *et al.*, 2002), les annélides (Ville, *et al.*, 1997 ; Dhainaut & Scaps, 2001), les crustacés (Lee, *et al.*, 2001; Yamuna, *et al.*, 2002), les poissons (Dethloff & Bailey, 1998; Michel & Hollebeck, 1999), les insectes (Wiesner, *et al.*, 1996; Aaltonen, *et al.*, 2000; Pereira, *et al.*, 2001), et chez les mammifères (Ashorn, 1982; Flipo, *et al.*, 1992; Kim & Park, 2002). Il semblait donc essentiel d'adapter ce test à la palourde asiatique.

Cette première évaluation va également permettre la détermination de la toxicité aiguë afin d'apprécier la toxicité du contaminant type testé vis-à-vis des hémocytes.

L'Organisation pour la Coopération et le Développement Economique (OCDE) a donné une définition des études de toxicologie aiguë dans les lignes directrices pour les essais et l'évaluation des produits chimiques (OCDE, 1981) : « *C'est l'effet néfaste qui se produit dans un court laps de temps, et qui résulte de l'administration d'une simple dose de la substance ou de multiples doses répétées en 24 heures* ». La toxicité aiguë d'un produit est étudiée :

- pour déterminer le degré de toxicité de cette substance chimique (relation entre la dose et les effets défavorables)
- pour comparer sa toxicité par rapport aux substances déjà connues
- pour déterminer les effets toxiques spécifiques
- pour fournir des informations sur le mode d'action toxique.

Les hémocytes de bivalves peuvent donc être utilisés dans l'exposition d'organismes à des polluants. Les hémocytes et l'hémolymph sont responsables du transport des xénobiotiques depuis l'organe d'entrée (branchies, manteau, glande digestive) vers les reins ou les autres tissus où auront lieu la détoxification ou l'accumulation de ces produits.

Les hémocytes sont facilement accessibles et en quantité relativement suffisante dans l'hémolymph prélevée dans le sinus du muscle adducteur postérieur des bivalves. Ils peuvent, de plus, être conservés *in vitro* plusieurs heures afin de pouvoir en examiner les propriétés.

Pour pouvoir effectuer une phagocytose, les hémocytes ont besoin de mobiliser leur cytosquelette. Celui-ci est essentiellement composé de filaments d'actine, de microtubules et de microfilaments intermédiaires. La formation de l'actine nécessite du calcium, or le cadmium possède un rayon atomique très proche de celui-ci (calcium 0,99Å et cadmium 0,97Å). Le cadmium pourra remplacer le calcium au sein de la molécule d'actine, sans toutefois en jouer le rôle, et empêcher ainsi le bon déroulement des étapes de phagocytose.

Les objectifs principaux de cette étape préliminaire étaient la mise au point de la mesure de l'activité de phagocytose des hémocytes de *C. fluminea*, puis l'évaluation de l'immunocompétence en fonction d'un gradient de concentration d'un contaminant type : le cadmium.

Les résultats de l'exposition *in vitro* des hémocytes au cadmium sont présentés dans l'article n°1

ARTICLE 1

***In vitro* exposure to cadmium of haemocytes from the Asian clam *Corbicula fluminea* (M.)**

Olivier Champeau, Germain Mazères, Jean-François Narbonne

Soumis à *Toxicology in Vitro*

***In vitro* exposure to cadmium of haemocytes from the Asian clam *Corbicula fluminea* (M.)**

Olivier Champeau‡ & Germain Mazères†, Jean-François Narbonne‡*

‡ LPTC Toxicologie Biochimique, Université de Bordeaux 1, UMR CNRS 5472, avenue des facultés, 33405 Talence cedex, France

† Laboratoire Biosciences de l'Aliment, Université Bordeaux 1, ISTAB USC INRA 429, avenue des facultés 33405 Talence cedex, France

*corresponding author (jf.narbonne@lptc.u-bordeaux1.fr ; Tel: +33.5.40.00.87.20; Fax: +33.5.40.00.87.19)

Abstract

Haemocytes play an essential role in the internal molluscan defence and xenobiotics, metallics or organics, may impair this defence capabilities by exerting immunotoxic effects on aquatic organisms. The aim of this study was to investigate the effects of cadmium on the integrity of the actin and microtubule cytoskeleton and its repercussion on the phagocytic activity of haemocytes of the freshwater Asian clam *Corbicula fluminea* (M.). Haemocytes were exposed 24 h to sublethal and lethal dose of cadmium ranging from 0.5 to 2000 μM . The lethal concentration (LC50) was estimated at 195 μM . We also observed a significant reduction in phagocytic activity at 100 μM . The organisation of cytoskeleton was altered in cells treated at 100 μM . F-actin was mainly distributed as bundles near the nucleus without any organisation. Microtubules were less extensive, forming a well-defined ring of fluorescence around the nucleus. Moreover at 500 μM , F-actin long protrusions and shrunk cells were detected, microtubule cytoskeleton was more diffuse around nucleus. These results indicate that cadmium has relatively specific damaging effects on both F-actin and microtubules favoring the impairment of the phagocytosis process.

Keywords: freshwater; bivalve; phagocytosis activity; cytoskeleton

Introduction

Freshwater organisms could be exposed to a wide variety of potentially toxic pollutants. Bivalve molluscs are often used as biomonitors in the assessment of water quality (Gagné *et al.*, 2002; Charissou *et al.*, 2004). The Asian clam *Corbicula fluminea* has been used in several experiments (Abaychi and Mustafa, 1988; Bassères *et al.*, 2004) due to its filter-feeding activity and capacity to accumulate contaminants (Inza *et al.*, 1997; Narbonne *et al.*, 1999; Barfield *et al.*, 2001). Deleterious effects of environmental contaminants may result from direct toxic action on the tissues or from more subtle alterations in homeostatic mechanisms, such as the immune system (Auffret and Oubella, 1997). The immune defence of bivalves comprises cell-mediated and humoral mechanisms in which haemocytes play a key role.

The immune response requires haemocyte activation, induced by the presence of foreign particles. The activated cells migrate towards these particles and eliminate them by phagocytosis.

Many aspects of cell morphology and function depend on the cytoskeleton. Migration and phagocytosis involve extracellular matrix proteins, cell-adhesion molecules and cytoskeletal elements such as actin filaments and microtubules. These elements are implicated in the maintenance of the steady state distribution of endosomes and lysosomes, as well as in membrane trafficking between these two organelles (Liu *et al.*, 1997).

In addition, haemocytes are also implicated in wound and shell repair, and are vehicles for transferring nutrients and oxygen to tissues and removing waste from the body (Cheng, 1981). Bivalve haemocytes may also be responsible for transporting and/or storing metals. As bivalves have an open circulatory system, haemocytes are exposed to pollutants such as metals and may accumulate high levels, mainly in lysosomes (Pauley and Nakatani, 1968; Viarengo, A. *et al.*, 1981; Moore, 1990; Bordin *et al.*, 1996).

Among the metals that are released into aquatic ecosystems, cadmium is considered to be one of the most toxic to the biota (Malley, 1996). Cadmium is mainly used in the production of chemical stabilizers and pigments, in the electroplating industry and is also released as a by-product from other anthropogenic activities. Cadmium is found in some soil solutions, urban runoff waters, landfill leachates, polluted river and groundwaters (Von Gunten *et al.*, 1991; Holm *et al.*, 1995). In the aquatic literature, cadmium is often considered to have no physiological function. However, cadmium is far from being inert in cellular processes and tends to be a relatively stable divalent cation under biological conditions.

Very few data on the immune responses to pollutant are available on freshwater molluscs. The aim of the present work was to investigate the effect of cadmium on haemocytes viability and its impact on the cytoskeleton, actin filaments and microtubules, in relation to phagocytotic activity. In a first approach, the effects were examined *in vitro* on haemocytes.

Materials and methods

Reagents and antibodies

Chemicals and materials were obtained from the following sources: MEM and gentamycin were purchased from Gibco BRL. Cadmium chloride ($\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) was obtained from Fluka. All other chemicals were from Sigma Aldrich (Saint Quentin-Falavier, France).

Anti β -tubulin antibodies were raised in rabbit and were purchased from Santa Cruz biotechnologies, secondary fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled anti-rabbit antibodies were from Sigma.

Experimental design

Animals were collected in the river Isle at Bénévent (Dordogne, France). Haemolymph of 2 groups of 35 animals was withdrawn from the posterior adductor muscle sinus using a 1 mL syringe fitted with a 26-gauge needle through a notch on the shell. For phagocytosis and cell viability test, 105 cells were placed in 3 wells for each conditions in a 96 wells polystyrene microplate and for fluorescence assays, haemocytes were left to attach on glass coverslips in 6 wells microplates. Haemocytes were then let to attach at 20°C for 90 min. (optimum time of adherence). Supernatants were then replaced by the culture medium adapted for freshwater molluscs (modified minimum Eagle's medium, 50 mOsm, measured with a freezing point osmometer Roebing) supplemented with 1‰ gentamycin or replaced by culture medium containing different concentrations of cadmium.

Cadmium exposure

Stock solution of cadmium chloride was prepared in nitric acid-rinsed glassware and stored in polyethylene bottles. Haemocytes were exposed at the concentrations of 0.5, 1, 10, 50, 100, 200, 300, 500, 1000, 1500 and 2000 μM of cadmium for 24 hr at 20°C. After contaminant exposure, cells were washed once with phosphate buffered saline (PBS) adapted for freshwater molluscs (KH_2PO_4 2.3 mM, Na_2HPO_4 3.8 mM, NaCl 8.5 mM, KCl 10 mM, pH 7.5). Afterwards, the different *in vitro* assays were performed.

Phagocytosis

100 μL of FITC-labelled yeast were added to each well and for a 2 hr. incubation, at room temperature in the dark, with a ratio yeast/haemocytes of 1/20. Just before fluorescence readings, wells were washed twice with PBS and 0.1 mg/L of trypan blue was added for quenching during 15 min. at 4°C in the dark (Blaise *et al.*, 2002). Fluorescence was measured at 485 nm excitation and 520 nm emission in a microplate reader (BioTek Synergy HT). Haemocytes washed once with PBS before protein cells assessment with the Lowry methods (Lowry *et al.*, 1951), by adding NaOH first for 10 min. to allow cells digestion. Phagocytotic activity is then expressed as inhibition of activity. Units are given as relative fluorescence units (RFU) per milligram of cell proteins.

Cell viability

Neutral red uptake assay is based on the incorporation of the dye into the lysosomes of living cells (Babich and Borenfreund, 1993). After 3 hr. incubation to allow uptake of the dye, cells were centrifuged 10 min. at 1000 rpm and washed twice with PBS. Dye was then extracted from intact cells with an 1% acetic acid-50 % ethanol (v/v) solution and absorbance was determined at 550 nm in the microplate reader (BioTek, Synergy HT).

Immunocytochemistry and fluorescence assays

Haemocytes were fixed in paraformaldehyde 4% (v/v) for 15 min., rinsed twice with PBS and then permeabilized 3 min. using 0,1% (v/v) Triton X-100 in PBS.

Cytoskeletal actin was visualized by phalloidin-FITC. 0.5 μM was added to the permeabilized cells for 45 min. Haemocytes were rinsed twice with PBS before observation. Microtubules were visualised by immunostaining. 1/100 diluted anti- β -tubulin antibody was added for 3 hr to the haemocyte preparation which was then rinsed 3 times with PBS (3 \times 15 min). The cells were then incubated with FITC-labelled anti-rabbit antibodies (1/100) for 90 min. Haemocytes were rinsed thoroughly with PBS before observation. Coverslips were mounted with 50% of glycerol in PBS. Slides were observed using epifluorescence microscopy (Olympus BX51).

Statistical analysis

The statistical significance of the difference between multiple groups was determined using ANOVA. When F was associated with a probability $P < 0.05$, intergroups comparisons were conducted using Tukey test. Unless indicated, all data were expressed as means \pm standard deviation and were representative of an average of 4 replicates. The lethal concentration inducing 50% of mortality in 24 h were computed using a log-normal analysis.

Results

Cell viability

The exposure was carried out on a large scale of cadmium concentrations from 0.5 μM to 2000 μM and cell viability assay (figure 1) did not exert any significant differences for cells exposed from 0.5 μM to 100 μM compared to control. However, at 200 μM , cell viability was lowered to less than 40% and then decreased until 2000 μM where 90% cells died. The lethal concentration inducing 50% mortality among haemocytes after 24 hrs of exposure to cadmium (LC50-24h) was estimated to be 195 μM (confidence interval [155:261] $P < 0.05$).

Phagocytosis

The increase of the relative fluorescence unit per milligram of proteins (RFU/mg proteins) observed is related to an inhibition of phagocytosis activity (figure 2) as the dose of cadmium increased. This indicates that the quantity of fluorescent yeasts ingested by haemocytes decreased as the dose of cadmium increased. The haemocyte phagocytosis activity was clearly and continuously reduced from 100 to 2000 μM of cadmium. In addition, the first significant decrease in phagocytosis activity was observed for 100 μM . This concentration was found to be the closest value before the LC50-24h.

Cytoskeletal responses

The actin stained with FITC-conjugated phalloidin reveals the architecture of haemocyte microfilaments. In untreated cells (figure 3A), sheet-like lamellipodia were seen frequently and the cell shape varied in accordance with the cell mobility. In the lamellipodia, F-actin showed the normal net-like distribution. Small cytoplasmic prolongations such as filopodia (protrusion involved in phagocytosis and cell movement) were also observed. Untreated cells demonstrate a general tendency to aggregate.

At 100 μM of cadmium (figure 3B) cells presented a general rounded morphology. The actin cytoskeleton was less developed and desorganised showing mainly clumped bundles near the nucleus. Filopodia were still present, but lamellipodia were absent.

At 500 μM cadmium (figure 3C), haemocytes were retracted and possessed a few long and thin filopodia. Additionally staining revealed a diffuse fluorescence within the cells compared to the well-defined actin fibers.

β -tubulin immunostaining allowed revelation of microtubules within haemocytes. In untreated cells (figure 4A), the immunofluorescence exhibits a typical microtubule network, i.e. a strong fluorescence near the nucleus (centrosome) decreasing toward the cell periphery, a pattern typically found in cultured cells. The microtubules radiate from the perinuclear part where they are more numerous, toward the cell periphery where they are relatively sparse. Membrane extensions, lamellipodia, are sustained by microtubules cytoskeleton.

Both at 100 μM and at 500 μM of cadmium, the microtubule cytoskeleton was drastically decreased representing a ring around the nucleus. This ring, appearing sharper at 100 μM (figure 4B), became diffused at 500 μM concentration (figure 4C).

A general observation of cells during screening showed less aggregated haemocytes as the dose of cadmium increased.

Discussion

Neutral red assay provides a good test to assess cell viability, that can also be used as endocytic toxicity test (Gómez-Mendikute *et al.*, 2002). Cadmium in freshwater conditions is more bioavailable in the water column where the major component is Cd^{2+} whereas in marine environment cadmium is mainly present as CdCl_2 (WHO, 1992). This could explain the highest sensitivity of clam's haemocytes to cadmium compared to those of *Mytilus galloprovincialis*. With the mussel *M. galloprovincialis*, the $\text{LC}_{50-24\text{h}}$ was found to be $750 \mu\text{M}$ when using the neutral red assay or $400 \mu\text{M}$ with the XTT assay (Olabarrieta *et al.*, 2001). However, viability obtained with these concentrations are within the range found in other studies. No significant difference in haemocyte viability was found for cells cultured in the presence of any metals at concentrations ranging from 10^{-9} to 10^{-5} M with several marine and freshwater molluscs (Sauvé *et al.*, 2002a). Our results gave approximately the same range from 10^{-7} to 10^{-4} M, showing that sensitivity of the Asian clam haemocytes was equivalent to most of the earlier molluscs assayed.

Phagocytosis is one of the most important immune defence in bivalve molluscs, occurring prior to the intracellular killing of invasive pathogens. It is important to understand defence mechanisms that allow these organisms to withstand challenges to their physiological well being. Haemocytes could be considered as equivalent to the white blood cells of vertebrates, protecting against disease and other trauma (Chisholm and Smith, 1995; Sullivan *et al.*, 1998; Haug *et al.*, 2002; van de Braak *et al.*, 2002).

Metals are known to have immunotoxic effects in aquatic organisms (Anderson, 1993; Fugere *et al.*, 1996; Brousseau *et al.*, 1999; Sauvé *et al.*, 2002b). With the freshwater mussel, *Dreissena polymorpha*, the nominal concentration of cadmium inducing 50% of inhibition of the phagocytosis activity ($\text{EC}_{50-18\text{h}}$) was found to be $470 \mu\text{M}$ (Sauvé *et al.*, 2002a) which is within our two first values (300 and $500 \mu\text{M}$) significantly different from control.

In vitro exposure of haemocytes to cadmium showed a decrease in phagocytosis activity when concentration are high (Fugere *et al.*, 1996; Sauvé *et al.*, 2002a). However, at low concentration, cadmium appears to stimulate phagocytotic activities of haemocytes. Enhanced phagocytotic activity of haemocytes from bivalves exposed *in vivo* to cadmium has been demonstrated (Olabarrieta *et al.*, 2001). Nevertheless, this enhancement occurring at low dose, it is generally considered that any changes in phagocytotic activities, stimulation or depression, can be seen as a response to pollutant. All haemocytes activities are based on cytoskeletal filaments polymerization and depolymerization, any perturbation would impair these activities. It has been demonstrated that the cytoskeleton is an intracellular target of heavy metal contamination (Fagotti *et al.*, 1996; Olabarrieta *et al.*, 2001; Gómez-Mendikute and Cajaraville, 2003).

Because of its analogy to calcium, cadmium can enter haemocytes through Ca^{2+} pathway, and after several cascade events, leads to an increase in cytosolic Ca^{2+} levels (Verbost *et al.*, 1989). Such cadmium-induced changes in Ca^{2+} equilibrium are of extreme importance considering the role played by calcium in regulating assembly and maintenance of actin structure.

With micromolar concentration of Cd^{2+} a shift of the equilibrium between F- and G-actin occurs in favor of disassembly (Wang *et al.*, 1996). Many studies have demonstrated that cadmium interferes with the dynamics of actin filaments in various types of cells (DalleDonne *et al.*, 1997; L'Azou *et al.*, 2002). After 6 hrs of treatment, the effect of cadmium ($10 \mu\text{M}$) on F-actin of Madin-Darby Canine Kidney cells resulted in the breakdown of actin filaments. Effect of cadmium on actin was reversible if cells were returned to culture medium (Mills and Ferm, 1989). In our study we observed a negative effect of the heavy metal on actin; dense actin aggregations were formed and were distributed in the cell body (Li *et al.*, 1993). The phalloidin staining proved that the aforementioned bundles contain actin aggregates indicating actin depolymerization or at least fragmentation. Similar swellings are described in retraction fibres (Taylor and Robbins, 1963) or sympathetic neurons (Landis, 1985). In haemocytes exposed to the highest cadmium concentration,

only filopodia were observed. The difference between lamellipodia and filopodia formation lies in the type of protein occurring in actin polymerization. On one hand the branching of polymerizing actin in lamellipodia is made thanks to the ARP2/3, on the other hand filopodia formation occurs when Ena/VASP proteins are associated with the ends of filaments at the tips of filopodia, where actin filaments are bundled. (Small, 1994; Lambrechts *et al.*, 2004). The presence of only filopodia observed at highest concentrations would suggest that the branching of polymerizing actin could be altered. As several proteins such as Ena/VASP, fimbrin and fascin act in the bundling of filopodia (Lambrechts *et al.*, 2004), some of them might have been perturbed by cadmium in their activity.

Microtubules appear to play multiple roles in immune cells. Reorientation of the microtubules organizing centre occurs in macrophages during chemotaxis (Nemere *et al.*, 1985). The formation of actin adhesion structures, termed podosomes, requires the presence of microtubules (Linder *et al.*, 2000). In control, distribution of microtubules within the cell shows a normal network pattern whereas this network is lost when cells are exposed to cadmium. It has been shown that cadmium affects microtubules by activating calmodulin associated with the cytoskeleton. Cadmium and calcium having very similar ionic radii (0.99\AA vs 0.97\AA), this supports the hypothesis that cadmium acts similarly to calcium in inducing microtubule disassembly (Perrino and Chou, 1986). An other major aspect is that cadmium is an effective sulfhydryl binding compound and so is able to reduce the amount of free sulfhydryl groups on tubulin which are essential for microtubule polymerization (Wallin and Hartley-Asp, 1993). This may be relevant to the mechanism of Cd-mediated cellular injury. Action of cadmium seems to be widely equivalent through different species. Exposure of onion cells to $50\ \mu\text{M}$ of CdCl_2 resulted in profound disturbance of microtubule organization resulting from severe disassembly of microtubules evidenced by numerous short microtubule fragments at the cell periphery (Dovgalyuk *et al.*, 2003). Similar effect were shown in the Swiss 3T3 mouse cells exposed to CdCl_2 (Chou, 1989). Such abnormality of microtubule organization may result from an inappropriate activation on calmodulin by cadmium ions (Perrino and Chou, 1986). Then, circular fluorescence observed in our experiment around nucleus might be due to disruption of polymerizing microtubules. Disruption of microtubules was also observed with other heavy metals. Lead salts showed an inhibitory effect of assembly of tubulin in a range of $20\text{--}60\ \mu\text{M}$. Mercury(II) inhibits microtubule assembly at concentration above $1\ \mu\text{M}$, with a complete inhibition at $10\ \mu\text{M}$ (Thier *et al.*, 2003).

As described, a diminution of aggregation phenomenon was observed with the increase of cadmium concentration. An important characteristic of haemocytes in bivalves molluscs is that this phenomenon proceeds in serum-free media such as isoosmotic buffers (Auffret and Oubella, 1997). (Wolmarans and Yssel, 1990) showed in the snail *Bulinus africanus*, that no other stimulus than Ca^{2+} in the medium is required to induce haemocytes aggregation. However, it has been reported that low concentrations of cadmium, in the range of our experiment, may inhibit this aggregation (Philp, 1999).

Cytoskeletal alterations lead to a reduced phagocytic activity, a decreased ability of haemocytes to adhere to the substrate and to interact with foreign particles. These alterations could be directly mediated by metals bonding with cytoskeletal structural proteins, followed by their denaturation, and indirectly by either alterations in calcium homeostasis mechanisms or oxidation of the SH groups of cytoskeletal proteins mediated by ROS. Heavy metals, such as Cu, Cd, Zn, and Hg, are known to have a high affinity for SH groups, including those present in Ca^{2+} -ATPases (Viarengo, A. and Nicotera, 1991). Consequently, inactivation of Ca^{2+} -ATPases may cause longlasting and diffuse increases in cytosolic Ca^{2+} concentrations (Viarengo, A. and Nicotera, 1991; Viarengo, A., 1994), which in turn cause alterations in cytoskeletal organization, thus compromising important aspects of cell physiology, e.g., adhesion, motility, and phagocytic activity, as observed in both mammalian thymocytes and tunicate amoebocytes exposed to butyltins (Chow and Orrenius, 1994; Cima *et al.*, 1998).

In conclusion, the present study shows that haemocytes from *Corbicula fluminea* are in general as sensitive as other species when they are exposed in vitro to cadmium. The LC50-24h has been found to be at 195 μM and the first significant response of phagocytosis inhibition was at 100 μM . This response occurred well before any noticeable loss of viability in haemocytes. Deleterious effects on cytoskeleton filaments can be observed from 100 μM of cadmium onwards where it is disrupted compared to control. In most cases, responses of clam haemocytes are in the range of the one observed in other species. Then the use of *Corbicula fluminea* haemocytes for incubation testing could be relevant for other testings due to their early response in phagocytotic activity and allow comparisons with other bivalves species.

This work was a first step in order to assess the possible use of haemocytes. They will be used on further experiments on the influence of cadmium on the whole organisms to assess not only its influence on phagocytosis but also on other biomarkers. Moreover, additional studies on metal impacts on proteins involved in branching and bundling of actin fibers will be conducted.

Acknowledgement

This work was granted by a PhD from TOTAL

References

- Abaychi, J.K., Mustafa, Y.Z., 1988. The asiatic clam, *Corbicula fluminea*: An indicator of trace metal pollution in the Shatt al-Arab River, Iraq. *Environmental Pollution* 54, 109-122.
- Anderson, R.S., 1993. Modulation of nonspecific immunity by environmental stressors. In: Couch, J.A., Fournie, J.W. (Eds.), *Pathobiology of marine and estuarine organisms*. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 483–510.
- Auffret, M., Oubella, R., 1997. Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: *in vitro* measurement and experimental modulation by xenobiotics. *Comparative Biochemistry and Physiology* 118A, 705-712.
- Babich, H., Borenfreund, E., 1993. Applications of the neutral red cytotoxicity assay to risk assessment of aquatic contaminants: an overview. In: Landis, W.G., Hughes, J.S., Lewis, M.A. (Eds.), *Environmental Toxicology and Risk Assessment*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, p. 215-229.
- Barfield, M.L., Farris, J.L., Black, M.C., 2001. Biomarker and bioaccumulation responses of Asian clams exposed to aqueous cadmium. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 63A, 495-510.
- Bassères, A., Simonet, F., Lafont, M., Coste, M., Narbonne, J.-F., 2004. Validation of biomarkers for impact evaluation of aqueous industrial waste in mesocosms. *Water Science and Technology* 49, 123-130.
- Blaise, C., Trottier, S., Gagné, F., Lallement, C., Hansen, P.D., 2002. Immunocompetence of bivalve hemocytes as evaluated by miniaturized phagocytosis assay. *Environmental Toxicology*, 160-169.

- Bordin, G., McCourt, J., Cordeiro Raposo, F., Rodriguez, A.R., 1996. Trace metals in the marine bivalve *Macoma balthica* in the Westerschelde estuary. Variability of the role of cytosol in metal uptake by the clams. *The Science of the Total Environment* 180, 241-255.
- Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H., Fournier, M., 1999. Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following in vitro exposure to heavy metals. *Toxicology* 142, 145-156.
- Charissou, A.M., Cossu-Leguille, C., Vasseur, P., 2004. Relationship between two oxidative stress biomarkers, malondialdehyde and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, in the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *The Science of the Total Environment* 322, 109-122.
- Cheng, T.C., 1981. Bivalves. In: Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F. (Eds.), *Invertebrates blood cells - 1 - General aspects, animals without true circulatory systems to cephalopods*. Academic Press, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco, p. 233-300.
- Chisholm, J.R., Smith, V.J., 1995. Comparison of antibacterial activity in the hemocytes of different crustacean species. *Comparative Biochemistry and Physiology* 110A, 39-45.
- Chou, I.N., 1989. Distinct cytoskeletal injuries induced by As, Cd, Co, Cr and Ni compounds. *Biomedical and Environmental Sciences* 2, 358-365.
- Chow, S.C., Orrenius, S., 1994. Cytoskeleton modification in thymocytes induced by immunotoxicant tributyltin. *Toxicology and Applied Pharmacology* 127, 19-26.
- Cima, F., Ballarin, L., Bressa, G., Burighel, P., 1998. Cytoskeleton alterations by tributyltin (TBT) in tunicate phagocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 40, 160-165.
- DalleDonne, I., Milzani, A., Colombo, R., 1997. Actin assembly by cadmium ions. *Biochimica and Biophysica Acta* 1357, 5-17.
- Dovgalyuk, A., Kalynyak, T., Blume, Y.B., 2003. Heavy metals have a different action from aluminium in disrupting microtubules in *Allium cepa* meristematic cells. *Cell Biology International* 27, 193-195.
- Fagotti, A., Di Rosa, I., Simoncelli, F., Pipe, R.K., Panara, F., Pascolini, R., 1996. The effects of copper on actin and fibronectin organization in *Mytilus galloprovincialis* haemocytes. *Developmental & Comparative Immunology* 20, 383-391.
- Fugere, N., Brousseau, P., Krzystyniak, K., Coderre, D., Fournier, M., 1996. Heavy metal-specific inhibition of phagocytosis and different in vitro sensitivity of heterogeneous coelomocytes from *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Toxicology* 109, 157-166.
- Gagné, F., Blaise, C., Aoyama, I., Luo, R., Gagnon, C., Couillard, Y., Campbell, P., Salazar, M., 2002. Biomarker study of a municipal effluent dispersion plume in two species of freshwater mussels. *Environmental Toxicology* 17, 149-159.
- Gómez-Mendikute, A., Etxeberria, A., Olabarrieta, I., Cajaraville, M.P., 2002. Oxygen radicals production and actin filament disruption in bivalve haemocytes treated with benzo(a)pyrene. *Marine Environmental Research* 54, 431-436.

- Gómez-Mendikute, A., Cajaraville, M.P., 2003. Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. *Toxicology in Vitro* 17, 539-546.
- Haug, T., Kjuul, A.K., Stensvag, K., Sandsdalen, E., Styrvold, O.B., 2002. Antibacterial activity in four marine crustacean decapods. *Fish and Shellfish Immunology* 12, 371-385.
- Holm, P.E., Andersen, S., Christensen, T.H., 1995. Speciation of dissolved cadmium: Interpretation of dialysis, ion exchange and computer (GEOCHEM) methods. *Water Research* 29, 803-809.
- Inza, B., Ribeyre, F., Maury-Brachet, R., Boudou, A., 1997. Tissue distribution of inorganic mercury, methylmercury and cadmium in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) in relation to the contamination levels of the water column and sediment. *Chemosphere* 35, 2817-2836.
- Lambrechts, A., Van Troys, M., Ampe, C., 2004. The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36, 1890-1909.
- Landis, S.C., 1985. Environmental influences on the development of sympathetic neurons. In: Bottenstein, J.E., Sato, G. (Eds.), *Cell Culture in the Neurosciences*. Plenum Press, New York, p. 169-192.
- L'Azou, B., Dubus, I., Ohayon-Courtes, C., Labouyrie, J.-P., Perez, L., Pouvreau, C., Juvet, L., Cambar, J., 2002. Cadmium induces direct morphological changes in mesangial cell culture. *Toxicology* 179, 233-245.
- Li, W., Zhao, Y., Chou, I.N., 1993. Alterations in cytoskeletal protein sulfhydryls and cultured cells exposed to cadmium and nickel ions. *Toxicology* 77, 65-79.
- Linder, S., Hufner, K., Wintergest, U., Aepfelbacher, M., 2000. Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages. *Journal of Cell Science* 113, 4165-4176.
- Liu, J., Thomas, L., Warren, R.A., Enns, C.A., Cunningham, C.C., Hartwig, C.H., 1997. Cytoskeletal protein ABP-280 directs the intracellular trafficking of furin and modulates protein processing in the endocytic pathway. *Journal of Cell Biology* 139, 1719-1733.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-273.
- Malley, D.F., 1996. Cadmium whole-lake experiment at the Experimental Lakes Area: an anachronism? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53, 1862-1870.
- Mills, J.W., Ferm, V.H., 1989. Effect of cadmium on F-actin and microtubules of Madin-Darby canine kidney cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 101, 245-254.
- Moore, M.N., 1990. Lysosomal cytochemistry in marine environmental monitoring. *Histochemistry Journal* 22, 187-191.

- Narbonne, J.F., Djomo, J.E., Ribera, D., Ferrier, V., Garrigues, P., 1999. Accumulation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed to sediment by the mollusk *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 42, 1-8.
- Nemere, I., Kupfer, A., Singer, S.J., 1985. Reorientation of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center inside macrophages subjected to a chemotactic gradient. *Cell Motility and Cytoskeleton* 5, 17-29.
- Olabarrieta, I., L'Azou, B., Yuric, S., Cambar, J., Cajaraville, M.P., 2001. *In vitro* effects of cadmium on two different animal cell models. *Toxicology in Vitro* 15, 511-517.
- Pauley, G.B., Nakatini, R.E., 1968. Metabolism of the radioisotope ^{65}Zn in the freshwater mussel *Anodonta californiensis*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 25, 2691-2694.
- Perrino, B.A., Chou, I.N., 1986. Role of calmodulin in cadmium-induced microtubule disassembly. *Cell Biology International Reports* 10, 565-573.
- Philp, R.B., 1999. Cadmium content of the marine sponge *Microciona prolifera*, other sponges, water and sediment from the eastern Florida panhandle: possible effects on *Microciona* cell aggregation and potential roles of low pH and low salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology* 124C, 41-49.
- Sauvé, S., Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Senecal, L., Goudreau, P., Fournier, M., 2002a. Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: in vitro exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquatic Toxicology* 58, 189-200.
- Sauvé, S., Hendawi, M., Brousseau, P., Fournier, M., 2002b. Phagocytic response of terrestrial and aquatic invertebrates following in vitro exposure to trace elements. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 52, 21-29.
- Small, J.V., 1994. Lamellipodia architecture: actin filament turnover and the lateral flow of actin filaments during motility. *Seminars in Cell Biology* 5, 157-163.
- Sullivan, J.T., Galvan, A.G., Lares, R.R., 1998. Comparison of several types of allografts in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata). *Journal of Invertebrates Pathology* 71, 1-8.
- Taylor, A.C., Robbins, E., 1963. Observations on microextensions from the surface of isolated vertebrate cells. *Developmental Biology* 7, 660-673.
- Thier, R., Bonacker, D., Stoiber, T., Bohm, K.J., Wang, M., Unger, E., Bolt, H.M., Degen, G., 2003. Interaction of metal salts with cytoskeletal motor protein systems. *Toxicology letters* 140-141, 75-81.
- van de Braak, C.B., Botterblom, M.H., Taverne, N., van Muiswinkel, W.B., Rombout, J.H., van der Knaap, W.P., 2002. The roles of haemocytes and the lymphoid organ in the clearance of injected *Vibrio* bacteria in *Penaeus monodon* shrimp. *Fish and Shellfish Immunology* 13, 293-309.
- Verbost, P.M., Flik, G., Pang, P.K.T., Lock, R.A.C., Weendelaar Bonga, S.E., 1989. Cadmium inhibition of the erythrocyte Ca^{2+} pump. A molecular interpretation. *Journal of Biology and Chemistry* 264, 5613-5615.

- Viarengo, A., Zanicchi, G., Moore, M.N., Orunesu, M., 1981. Accumulation and detoxication of copper by the mussel *Mytilus galloprovincialis*, Lam.: a study of the subcellular distribution in the digestive gland cells. *Aquatic Toxicology* 1, 147-157.
- Viarengo, A., Nicotera, P., 1991. Possible role of Ca^{2+} in heavy metal cytotoxicity. *Comparative Biochemistry and Physiology* 100C, 81-84.
- Viarengo, A., 1994. Heavy metal cytotoxicity in marine organisms : effects on Ca^{2+} homeostasis and possible alteration of signal transduction pathway. *Advances in Comparative and Environmental Physiology* 20, 85-109.
- Von Gunten, H.R., Karametaxas, G., Krahenbuhl, U., Kuslys, M., Giovanoli, R., Hoehn, E., Keil, R., 1991. Seasonal biogeochemical cycles in riverborne groundwater. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 55, 3597-3609.
- Wallin, M., Hartley-Asp, B., 1993. Effects of potential aneuploidy inducing agents on microtubule assembly in vitro. *Mutation Research* 287, 17-22.
- Wang, Z., Chin, T.A., Templeton, D.M., 1996. Calcium-independent effects of cadmium on actin assembly in mesangial and vascular smooth muscle cells. *Cell Motility and Cytoskeleton* 33, 208-222.
- WHO, 1992. Cadmium. In: (Eds.), *Environmental Health Criteria* 134. World Health Organization, Geneva, p. 280.
- Wolmarans, C.T., Yssel, E., 1990. Use of SEM and lectins to study *Bulinus africanus* leukocyte groups and their in vitro behavior over a time period. *Journal of Invertebrate Pathology* 56, 1-7.

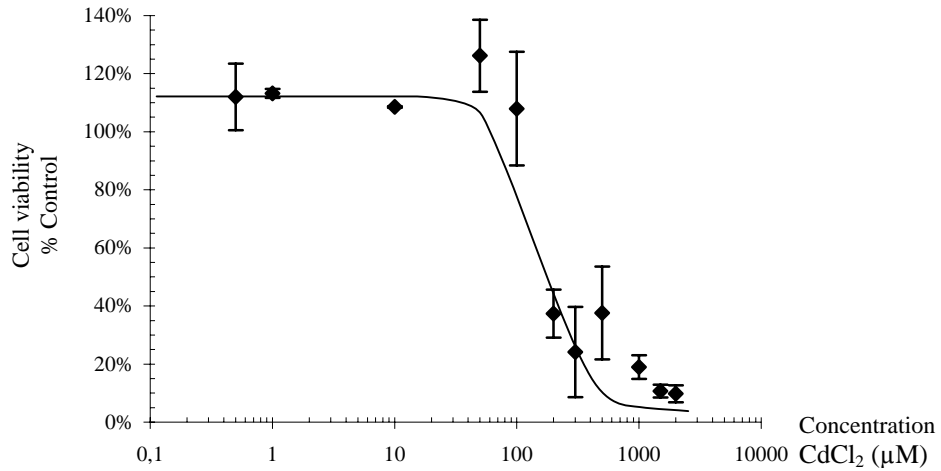


Figure 1 : Cell viability based on the neutral red assay in haemocytes cultures treated with cadmium. Results represent means and standard deviation of cell viability with the log-normal regression.

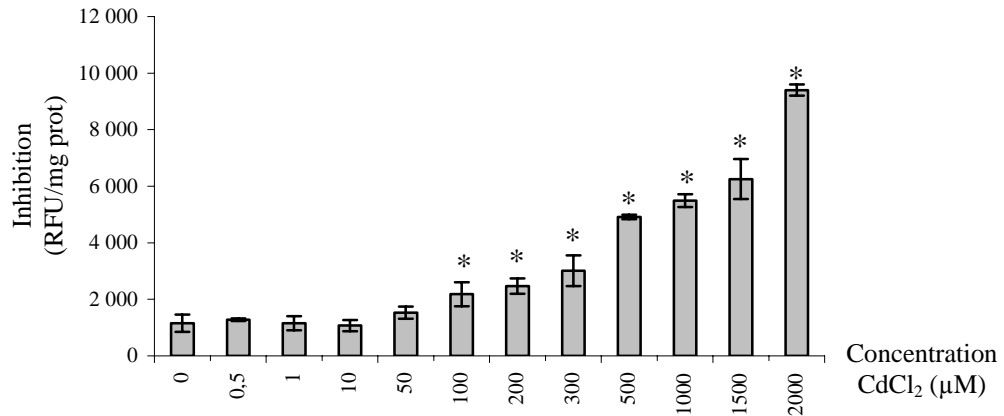


Figure 2 : Phagocytosis inhibition of haemocytes. Results represent means and standard deviation of 2 replicates with 3 measurements for each replicate. Asterisks represent significant differences ($P < 0.05$) with respect to control.

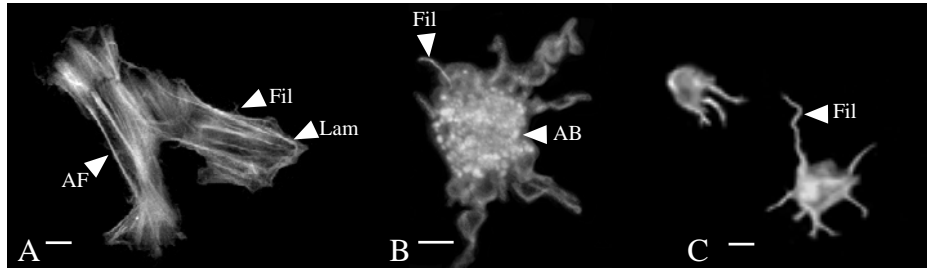


Figure 3 : F-actin staining with phalloidin. A. untreated haemocytes (scale bar: 10 μ m), B. haemocytes exposed to 100 μ M of cadmium (scale bar: 5 μ m) and C. haemocytes exposed to 500 μ M of cadmium (scale bar: 10 μ m). AB: Actin Bundles; AF: Actin Fibers; Fil: Filopodia; Lam: Lamellipodia.

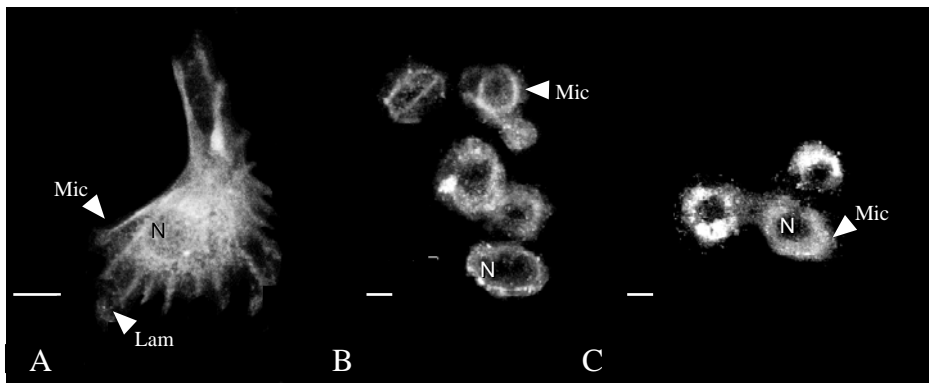


Figure 4 : β -tubulin immunostaining. A. untreated haemocytes, B. haemocytes exposed to 100 μ M of cadmium and C. haemocytes exposed to 500 μ M of cadmium. All scale bars are 10 μ m. Lam: lamellipodia; Mic: Microtubules; N: Nucleus.

La sensibilité des hémocytes est comparable à celle d'autres espèces, autorisant ainsi des comparaisons. L'inhibition de l'activité de phagocytose des hémocytes est dose dépendante, vérifiée par une perturbation de plus en plus prononcée du cytosquelette. Cette première approche nous permet de conserver l'activité de phagocytose des hémocytes comme biomarqueur d'immunotoxicité potentiel chez *C. fluminea* et d'en poursuivre l'étude à un niveau d'intégration supérieur, celui de l'individu.

IV.A.2 Expositions en aquariums

IV.A.2.1 Exposition au cadmium

Une exposition *in vitro* des hémocytes avec le cadmium permettra de déterminer les réponses des biomarqueurs au niveau de l'organisme entier en fonction de la concentration du contaminant type sélectionné (le cadmium) et du temps d'exposition.

Cette expérimentation permet la mise en place, sur l'individu entier, de la plupart des paramètres sélectionnés susceptibles d'être des biomarqueurs, parmi trois des grandes fonctions :

- en génotoxicité, l'utilisation du test du *DNA unwinding* et de la mesure des taux de bases oxydées (8-oxodG) seront évalués,
- en immunotoxicité, la mesure de l'activité de phagocytose sera abordée avec la technique des microbilles afin de réaliser une comparaison avec l'approche employant des levures,
- l'état général sera évalué par la mesure des réponses des lysosomes (stabilité lysosomiale et changements structuraux).

Les résultats de cette expérimentation, concernant l'activité de phagocytose et des changements structuraux des lysosomes, sont reportés dans l'article n°2.

ARTICLE 2

**Immuno- and cytotoxicological responses of the Asian clam *Corbicula fluminea* (M.)
experimentally exposed to cadmium**

Olivier Champeau, Michel Auffret, Miren P. Cajaraville, Anne Bassères, Jean-François Narbonne

Accepté dans *Biomarkers*

Immuno- and cytotoxicological responses of the Asian clam *Corbicula fluminea* (M.) experimentally exposed to cadmium

OLIVIER CHAMPEAU¹, MICHEL AUFFRET², MIREN P. CAJARAVILLE³, ANNE BASSÈRES⁴, JEAN-FRANÇOIS NARBONNE^{1*}

¹Laboratoire de Physico-Toxico-Chimie des Systèmes Naturels, UMR 5472 CNRS, Université Bordeaux 1, Talence, France, ²LEMAR, UMR 6539, Institut Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Technopôle Brest-Iroise, Plouzané, France, ³Laboratory of Cell Biology and Histology, Department of Zoology and Cell Biology, University of the Basque Country, Bilbao, Basque Country, Spain, ⁴Pôle R&D Mont/Lacq, TOTAL, Service Environnement, Lacq, France.

Abstract

Bivalve molluscs as filter-feeding organisms are known to accumulate metals that can produce deleterious effects on organisms. In order to assess the possible use of immunocompetence and lysosomal responses as biomarkers of freshwater quality, the phagocytic activity of haemocytes and lysosomal alterations in the digestive gland cells were measured in the freshwater Asian clam exposed to cadmium. Clams were exposed in the laboratory to nominal concentrations of 3, 10, 21.4, 46.5 and 100µg/L of cadmium and sampled after 7, 15 and 30 days of exposure.

Results show a decrease of phagocytic activity as soon as 7 days of exposure from 10 µg/L of cadmium. The response was also observed as the exposure time increased. Lysosomes in digestive cells increased in size and number after 7 days of exposure as cadmium concentration increased. After 30 days of exposure, decrease in size and number indicated a changes in the response to the metal from 46.5 µg/L of cadmium.

Dose and time response in both phagocytic activity of haemocytes and lysosomal structure demonstrate the potential use of these biomarkers in freshwater biomonitoring.

Keywords : Bivalve, freshwater, haemocytes, phagocytosis, lysosomes

*Correspondence : Pr. Jean-François Narbonne, Laboratoire de Physico-ToxicoChimie des Systèmes Naturels, Avenue des Facultés, 33405 Talence Cedex, France.

Fax: +33 5 40 00 87 19. Email : jf.narbonne@lptc.u-bordeaux1.fr

Introduction

Bivalve molluscs represent useful organisms to perform toxicological studies since they live in direct contact with contaminated aquatic sediments and they are exposed to waterborne contaminants. Since many are filter-feeding organisms, bivalves and particularly marine mussels *Mytilus galloprovincialis* and *M. edulis* are suitable bioindicators for heavy metal contamination (Amodio-Cocchieri *et al.* 1993, Etxeberria *et al.* 1994, Narbonne *et al.* 1999, Devier *et al.* 2003). Additionally, the measurement of biological markers in such sentinel organisms allowed to detect sublethal and early pollutant effects on aquatic ecosystems (Livingstone 1993). The need for such bioindicator and sentinel organism in freshwater ecosystems has focused attention on the clam *Corbicula fluminea* (Müller) since few years (Abaychi and Mustafa 1988, Labrot *et al.* 1999, Tran *et al.* 2001, Vidal *et al.* 2001, Baudrimont *et al.* 2003, Ciutat and Boudou 2003, Bassères *et al.* 2004).

Originating from Asia, this opportunist species has progressively colonised USA and more recently Europe (Britton and Morton 1977, Araujo *et al.* 1993) to become a major component of benthic communities. Being both a filter- and a deposit-feeding species, *C. fluminea* is able to bioaccumulate heavy metals (Labrot *et al.* 1999) including cadmium (Abaychi and Mustafa 1988, Winter 1996, Baudrimont *et al.* 1997, Tran *et al.* 2001, Fraysse *et al.* 2002, Ciutat and Boudou 2003). The digestive gland of molluscs is a target organ in environmental pollution assessment. It accumulates pollutants of a diverse nature and actively participates in the detoxification process (Marigómez *et al.* 2002). Uptake and accumulation of pollutant can provoke measurable changes in volume, surface, size and number of lysosomes (Lowe *et al.* 1981, Marigómez *et al.* 1989, Cajaraville *et al.* 1995b, Marigómez *et al.* 1996, Marigómez and Baybay-Villacorta 2003). Changes in these cellular organelles have therefore been used as biomarkers of stress (Cajaraville *et al.* 2000). Most recently, the digestive lysosomal response in zebra mussel *Dreissena polymorpha* has been proposed as biomarker for the assessment of freshwater pollution (Giamberini and Cajaraville 2005).

In molluscs, principally in bivalves, haemocytes represent the main component of their immune system. They are, in addition, involved in various physiological functions including wound repair, shell formation and repair, nutrient digestion and transport and excretion (Cheng 1981, Glinski and Jarosz 1997). It has been established that haemocytes may be affected in their efficiency by environmental contaminants (Anderson *et al.* 1981, Renwranz 1990, Canesi *et al.* 2003, Gómez-Mendikute and Cajaraville 2003). Phagocytosis by haemocytes is the major line of defence against invading foreign material. Indeed, the central role of phagocytosis in immune defence and the sensitivity of this biological function to environmental xenobiotics in several other species (Loose *et al.* 1981, Kollner *et al.* 2002, Hillyer *et al.* 2003) have made it a major function to be assessed to evaluate immunosuppressive effects of pollutants.

A multitude of toxic compounds is released in the aquatic environment from point or diffuse sources. Among them, cadmium (Cd), a non-essential heavy metal with both natural and anthropogenic origins, is of long-standing environmental concern. Cadmium is found in some soil solutions, urban runoff waters, landfill leachates, polluted river and groundwaters (Von Gunten *et al.* 1991, Holm *et al.* 1995). Because of its ubiquity and its toxicity, cadmium is considered as a priority pollutant.

The aim of this study was to assess the effects of cadmium on the phagocytic activity of haemocytes and lysosomes of digestive gland cells of *Corbicula fluminea* and to set up and develop these biomarkers for further validation and applications.

Material and methods

Animal sampling and acclimatisation

One thousand and five hundred adults *Corbicula fluminea* (15 to 20 mm shell length) were collected from the banks of the non-polluted freshwater Cazaux-Sanguinet lake (Aquitaine, France), in march 2003. The excellent water quality makes this lake a reference site in environmental studies (Baumard *et al.* 1997, Vidal *et al.* 2001, Vidal *et al.* 2002). Clams were transported back to the laboratory in plastic tanks filled with lake water and subsequently transferred into glass aquariums for an eight-day acclimatisation period into dechlorinated and aerated tap water.

Experimental design

Forty animals were placed in each of 12 test aquaria. The aquaria contained 5L of dechlorinated tap water. Clams were not fed and were held under a natural light cycle. Aeration was provided continuously by air bubbling. Dead clams were removed to avoid water fouling. Physico-chemical parameters of the water were monitored every day during the experiment with an Universal Pocket Meter Multiline P4 WTW instrument (Wissenschaftlich Technische Werkstätten, Weilheim, Germany). The mean temperature was 17.8°C with a range of 16°C to 19°C, the mean pH 8.5 with a range of 8.4 to 8.6, the mean dissolved O₂ was 8.7 mg/L with a range of 8.4 mg/L to 9.3 mg/L, NO₂⁻ was less than 0.005 mg/L and NH₄⁺ less than 0.02 mg/L, water hardness was 9°F. Accordingly, water quality is regarded to be suitable for maintaining the test organisms.

Cadmium contamination

Stock solution of cadmium chloride (CdCl₂·2H₂O, Fluka) was prepared in nitric acid-rinsed glassware and stored in polyethylene bottles. Amounts of stock solutions were added to water in order to obtain the equivalent of logarithmic series of nominal cadmium concentrations: 0, 3, 10, 21.5, 46.4 and 100 µg/L. The water of each aquarium was renewed every 2 days with fresh, dechlorinated and aerated tap water and cadmium added according to the treatment. Animals were sampled after 7, 15 and 30 days of exposure and dissected on ice.

Biomarker measurements

Phagocytosis assay

This assay (Blaise *et al.* 2002) was conducted on 6 animals per condition, with 4 measures for each animal. Haemolymph was collected from the posterior adductor muscle sinus with a 1 mL syringe fitted with a 26-gauge needle through a notch near the posterior margin of the clam shell. Samples were maintained in an ice bath.

The phagocytosis assay was firstly improved with freshly harvested haemocytes of *Corbicula fluminea*. The optimal adhesion time of haemocytes to 96-well microplate was optimized by incubating 100 µl of fresh haemolymph in wells for different periods at 20°C. After each incubation period the supernatant (serum) was removed by aspiration, and non-adherent cells in each well were counted under microscope at 400× magnification with a Malassez cell. The time required to haemocytes to internalise particles was determined by varying the time of exposure of a fixed number of haemocytes in the presence of a known number of FITC marked yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in PBS for freshwater molluscs (KH₂PO₄ 2.3 mM, Na₂HPO₄ 3.8 mM, NaCl 8.5 mM, KCl 10 mM, pH 7.52, 66 mOsm). Free yeasts left are then counted under microscope at 400× magnification with a Malassez cell.

Phagocytic activity was assessed incubating haemocytes with fluoresbrite yellow-green yellow-green polystyrene microspheres (2 µm diameter) (Polysciences Europe) was determined by varying the time of exposure of a fixed number of haemocytes in the presence of polystyrene beads, in proportion of 1:50, haemocyte:beads, in PBS for freshwater molluscs (KH₂PO₄ 2.3 mM, Na₂HPO₄ 3.8 mM, NaCl 8.5 mM, KCl 10 mM, pH 7.52, 66 mOsm). Haemocytes were detached from well

bottom by adding 50 µl of trypsin (0.5 mg/mL final concentration) and incubated 5 minutes at 4°C. Cells were then fixed with paraformaldehyde 1% and stored at 4°C until analysis.

The percentage of cells containing fluorescent spheres was determined by flow cytometry using a FACScan (Becton Dickinson) with an air cooled argon laser, providing an excitation at 488 nm. Haemocyte cell populations were defined based on their forward (FSC) and right angle scatter (SSC) properties. Fluorescence emission was collected by the FL1 photomultiplier tube. A total of 10 000 events was acquired for each sample and stored in the list mode data format. The data were analysed once displayed as two-parameters, complexity (SSC) and cell size (FSC). The distribution histogram of the haemocytes population corresponding to three and more ingested FITC beads was retained to estimate phagocytic activity.

Lysosomal responses

Five visceral mass from freshly dissected animals were frozen in n-hexane at -70°C for 45 seconds (UNEP/RAMOGÉ 1999) and frozen in liquid nitrogen. Visceral mass were embedded in Jung's Tissue Freezing Medium. Sections (8 µm) were cut in a cryostat (Microm HM 500, Zeiss) at a cabinet temperature of -20°C. Sections were then collected onto warm glass slides and stored at -70°C until required for staining.

The cytochemical reaction for β-glucuronidase was demonstrated as in Moore (1976) with modifications (Cajaraville *et al.* 1989). Osmolarity of the different experimental media and incubation time were adapted to freshwater organisms. Briefly, polyvinyl alcohol at a 20% (w/v) concentration was used as colloid stabiliser, incubations were carried out at pH 4.5 and 37°C for 30 min. After post-coupling with Fast Garnet GBC and fixation in Baker's formol calcium, sections were counterstained with a 0.1% aqueous solution of Fast Green FCF for 10 min.

A stereological procedure was applied in order to quantify the structure of the digestive cell lysosomes in clams, with the aid of an automated image analysis system (Cajaraville *et al.* 1995b). The system, previously described in detail (Cajaraville *et al.* 1991), calculates the following parameters: lysosomal volume density ($V_v=V_L/V_C$), lysosomal surface density ($S_v=SL/V_C$), lysosomal surface to volume ratio ($S/V=SL/V_L$) and lysosomal numerical density ($N_v=NL/V_C$) where V, volume; S, surface; N, number; L, lysosomes and C, digestive cell cytoplasm (Lowe *et al.* 1981). The sample size was determined based on previous analyses on the stabilisation of mean and standard deviation values of the four parameters (Etxeberria *et al.* 1995, Marigómez and Baybay-Villacorta 2003).

Statistical analysis

To allow statistical comparison, the experiment was performed twice at the same time. All statistical evaluations were performed using Statistica 6.0 computer software package (Statsoft Inc., Maison-Alfort, France). Data fulfilling normal distribution and homogeneity of variance were submitted to a multivariate analysis with contaminant concentration and time of exposure as the independent variables. Whenever a significant ($p<0.05$) effect was established on a response, a Tukey HSD multiple comparison test was used to check significant ($p<0.05$) differences between means. For the stereological parameters on lysosomal responses, significant differences between paired means were determined using the Duncan's multiple range comparison data. Data for lysosomal V_v and N_v were logarithmically transformed before statistical analysis.

Results

Optimisation of phagocytosis assay

Phagocytosis measurements by flow cytometry have already been applied to crustaceans (Cardenas *et al.* 2000) and to freshwater and marine bivalves (Brousseau *et al.* 1999, Fournier *et al.* 2001,

Auffret *et al.* 2002, Sauvé *et al.* 2002). In order to consider possible differences between species, time of adhesion of haemocytes and phagocytosing time had to be assessed. Adherence time of haemocytes to the microplate was assayed up to 120 minutes (figure 1).

Although the maximum adherence time of haemocytes occurred after 120 minutes, we considered 90 minutes as the optimum time for cell adherence.

The time allowed for cells to phagocytose particles was then extended from 30 to 180 minutes (figure 2).

The maximum ingestion response occurred after 120 minutes. However, as previously, 90 minutes was deemed to be the optimal time (no significant differences between 90 minutes and 120 minutes).

These optimal times for adherence and phagocytic activity were used for further phagocytosis assessments.

Effect of cadmium on phagocytosis

The two-way analysis of variance demonstrated a significant effect of dose and time exposure separately and of the interaction of these two parameters on haemocytes phagocytosis activity (table 1).

The measurement of phagocytic activity (figure 3) demonstrated significant responses of haemocytes as the dose increased. At the first sampling time, the number of phagocytosing cells decreased significantly as the dose increased. Clams exposed to 100 µg/L of cadmium had a significantly lower phagocytic activity than those exposed to 10 and 46.4 µg/L of cadmium.

After 15 days of exposure, the activity of phagocytosis was lower than controls for most animals exposed to cadmium but not different from one another. Only animals exposed to 46.4 µg/L had a higher phagocytic activity than those exposed to 21.5 µg/L ($p < 0.05$). Except those exposed to cadmium at 10 µg/L, animals exposed for 30 days had a significantly different number of phagocytosing cells from control. It was reduced at the highest concentration (100 µg/L) by nearly 20% compared to controls. The trend of a decreased phagocytic activity with the dose increase was again observed as after 7 days of exposure.

Moreover, significant differences between times were observed. Clams treated with 3 µg/L of cadmium had a significantly ($p < 0.05$) lower level of phagocytosis after 30 days of exposure than clams exposed at the same dose after 7 or 15 days of exposure. A transient increase ($p < 0.05$) of phagocytic activity was observed after 15 days of exposure in animals exposed at 46.4 and 100 µg/L.

These results indicate a gradual sensitisation of haemocytes to cadmium with dose and time of exposure. Reduced phagocytosis activity was an early and sensitive response to cadmium exposure as a depression of the activity can be detected as soon as 7 days of exposure from a concentration of 10 µg/L (3 µg/L after 30 days).

Structural changes in lysosomes

The two-way analysis of variance indicated a significant effect of time and dose exposure for Vv (in log), Sv and S/V, whereas no effect of time was noticed for Nv (in log) (Table 2).

Variations of the stereological parameters (figure 4) indicated responses of the lysosomal compartment in the digestive gland.

After 7 days of exposure, the lysosomal compartment underwent a significant increase in volume (figure 4a), surface (figures 4b), size (figures 4c), and number (figure 4d) of lysosomes. The effects of cadmium at the highest concentrations (21.4, 46.4, 100 µg/L) are significant for all the stereological parameters (Vv, Sv, S/V and Nv). The lysosomal surface to volume ratio (S/V) (figure 4c) decreased as expected, as the dose of cadmium increased. Although there was a significant difference between exposed and non-exposed animals, no differences were found among the exposed animals. Since S/V is inversely related to lysosomal size, this indicated that the lysosomes

were enlarged (also indicated by increased V_v and S_v) and more numerous (increased N_v) as the concentration increased in the digestive cells of exposed clams.

After 15 days of exposure, most of the stereological parameters were kept at levels similar to those recorded in controls. Only clams exposed to 46.4 $\mu\text{g/L}$ had a V_v and S_v significantly different from control. The S_v is, in addition, significantly different from the one of animals exposed to 3, 10 and 21.5 $\mu\text{g/L}$. The S/V indicated that, at this time, the lysosomes have nearly the same size. The only significant differences stand with the S/V of animals exposed to 46.4 $\mu\text{g/L}$ compared to animals exposed to 3 and 100 $\mu\text{g/L}$ of cadmium. In addition, size of animals lysosomes exposed 15 days at this concentration are larger without being more numerous than 7 days before. Only animals exposed to the lowest concentrations (3 and 10 $\mu\text{g/L}$) showed more numerous lysosomes but without changing of size.

Increase of lysosomal volume, surface, size and number with dose increase were observed again after 30 days of exposure. However, this increase was restricted from lowest to medium concentrations (3 $\mu\text{g/L}$ to 21.5 $\mu\text{g/L}$), while endo-lysosomal compartment from animals exposed to the highest concentrations (46.5 and 100 $\mu\text{g/L}$) suffered a decrease in terms of volume, surface, size and number of lysosomes. This decrease had been observed firstly in animals exposed 15 days at 100 $\mu\text{g/L}$ of cadmium. After 30 days of exposure, this decrease was continued into endo-lysosomal compartment of animals exposed to 100 $\mu\text{g/L}$ of cadmium and then begun for animals exposed to 46.5 $\mu\text{g/L}$ of cadmium.

Discussion

Phagocytosis activity

We have shown in this study, for *Corbicula fluminea*, a decrease of the phagocytic activity of haemocytes at the first (7 days) and last sampling time (30 days). The same response has been observed in the crab *Paratelphusa hydrodromous* after exposure to sublethal cadmium chloride concentrations (Victor 1993). However, such clear inhibition was not observed after the second sampling time (15 days). Some studies have show no observed inhibition in cells from Cd-exposed animals for the clam *Tapes philippinarum* (Matozzo *et al.* 2001) and no apparent effect on phagocytosis for haemocytes exposed in vitro to cadmium up to 0.1 mM, showing that the toxicity of cadmium does not follow a linear pattern (Sauvé *et al.* 2002). It could be that the toxic effect of cadmium observed at 7 days is compensated by adaptative mechanisms at 15 days, but these mechanisms are no longer efficient at 30 days.

Once metal enters the organism, one of the inner defence mechanism of the mollusc includes the participation of haemocytes. Haemocytes move around the body in haemolymph and may penetrate a number of tissues of the body by amoeboid movements (Simkiss and Mason 1983) and remove metals from the haemolymph in order to keep the concentration in the blood below toxic levels. They can remove metallothioneins and other metals complex by phagocytosis from the plasma. But metals can be accumulated in cells and interact with their components directly (lysosomes (Lekube *et al.* 2000), cytoskeleton (L'Azou *et al.* 2002)) or indirectly (oxidative stress (Brennan and Schiestl 1996)).

All cell movements, displacement or phagocytosis, are supported by the cytoskeleton. Alterations of this cell compartment may explain the phagocytosis inhibition observed after 7 and 30 days of exposure to cadmium (Cima *et al.* 1998, Gómez-Mendikute and Cajaraville 2003).

In mammalian species such as the mouse, cadmium was found to exacerbate phagocytosis (Leffel *et al.* 2003). Cadmium was less toxic in bivalves molluscs as *Crossostrea virginica* (Anderson *et al.* 1992) or *Tapes philippinarum* (Matozzo *et al.* 2001). In our study we thus demonstrated the sensitivity of the Asian clam immune compartment to the exposure to cadmium.

Lysosomal responses

Our study showed that responses of the lysosomal compartment in the digestive gland cells of *Corbicula fluminea* occurred for the 7th day of exposure to the lowest concentration of cadmium (3 µg/L). The increase of stereological parameters (Vv, Sv and Nv) followed by a latter decrease (with numerical density lower than control after 30 days of exposure for clams exposed to 100µg/L) with values neighbouring controls. This pattern suggest an elimination of digestive cells lysosomes exposed to high concentrations.

After transport into haemocytes, several tissues can be target sites for accumulation or detoxication of metals in molluscs as the digestive gland (Marigómez *et al.* 2002). Metals are detoxified through sequestering them within digestive lysosomes and their accumulation within lysosomes has been thoroughly reported (Jeantet *et al.* 1985, Marigómez *et al.* 1990, Soto *et al.* 1999, Kadar *et al.* 2001, Desouky *et al.* 2002, Marigómez *et al.* 2002).

Under laboratory conditions, metals, such as Cu and Cd caused enlargement of lysosomes in the digestive gland of *Mytilus edulis* (Lowe and Clarke 1989) and *Littorina littorea* (Marigómez *et al.* 1989). Mixtures of metals such as Fe, Mn, Cu, Zn and particularly those rich in Pb, led to the same results in natural populations of the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* and *M. edulis*. In these studies, an increase in lysosomes size was concomitant with a decrease in their numbers. This suggests a process of smaller secondary lysosomes fusing to form large autolysosomes (Lowe *et al.* 1981). Our results are similar to those reported in other studies (Etxeberria *et al.* 1994, Giamberini and Pihan 1997, Giamberini and Cajaraville 2005), who report an increase in both size and number of lysosomes in the digestive cells of *M. galloprovincialis* and *D. polymorpha* exposed to Zn, Cu, Cd, Pb under field and experimental conditions. The lysosomal alterations they observed did not always show a linear dependence with metal concentrations. This may be related to the detoxication function of lysosomes. Digestive cell lysosomes are likely not accumulation sites but detoxification pouches and are very dynamic compartments (Soto *et al.* 1996b). Metals sequestration in lysosomes might thus contribute to reduce their availability, at least temporarily, and is followed by excretion of the extruded metal-loaded lysosomes (Viarengo and Nott 1993, Cajaraville *et al.* 1995b, Marigómez *et al.* 2002) demonstrated by the presence of black-silver deposit in the cell debris in the lumen (Soto *et al.* 1996a). This could explain the different lysosomal responses observed; metal-loaded heterolysosomes accumulate within the digestive cell apex to be ejected later through the disintegration process. This process is known to provoke the breaking of the cellular apex with exit of heterolysosomes and residual bodies to the tubule lumen (Cajaraville *et al.* 1995a) and seems to occur in *C. fluminea* exposed to high dose of cadmium for 30 days.

Lysosomal enlargement in the mollusc digestive gland can be induced not only by metals but also by various organic xenobiotics such as PAHs or PCBs (Lowe 1988, Lowe *et al.* 1995), oil-derived hydrocarbons (Lowe *et al.* 1981, Cajaraville *et al.* 1995a, Marigómez and Baybay-Villacorta 2003) and 1-naphthol (Cajaraville *et al.* 1989). These studies concluded that lysosomal enlargement represented a good indicator of general environmental stress (Cajaraville *et al.* 1995b, Cajaraville *et al.* 2000).

It has to be noticed that Asian clams may detect metals at low concentrations and avoid exposure (Tran *et al.* 2003) by reducing the volume of water used for their filtration activity (Barfield *et al.* 2001). Moreover, as animals were not fed, starvation could have affected results after 30 days of exposure. Nevertheless, as controls were not significantly different during the exposure times, it can be assumed that the observed effects are mainly due to cadmium exposure. But it can not be, however, completely excluded that interactions between starvation and contaminants might have occurred (Liess *et al.* 2001).

Finally, it is relevant to mention the high levels of coincidence between results of phagocytosis assays with haemocytes and results of lysosomal responses in digestive gland cells. A transient “recovery” of both biomarkers was observed at the second sampling time period. Both biomarkers

showed changes as early as 7 days of exposure whereas lysosomal changes occurred at slightly lower dose than suppression of phagocytosis.

In conclusion, the present experimental study showed that phagocytic activity of haemocytes and structural changes of the digestive lysosomal system reflected changes in exposure time and in metal concentrations. Therefore, immunocompetence and digestive lysosomal responses in *Corbicula fluminea* could be used as markers for the assessment of freshwater contamination.

Acknowledgements

This study is supported by a Ph.D grant from the Environment Department of the Petroleum Society TOTAL. Investigations in the laboratory of M.P. Cajaraville are supported by a grant to consolidated research groups of the University of the Basque Country.

References

- ABAYCHI, J. K. and MUSTAFA, Y. Z. 1988. The asiatic clam, *Corbicula fluminea*: An indicator of trace metal pollution in the Shatt al-Arab River, Iraq. *Environmental Pollution* 54: 109-122.
- AMODIO-COCCHIERI, R., DEL PRETE, U., ARNESE, A., GIULIANO, M., RONCIONI, A. 1993. Heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's) in marine organisms from the Ionian sea (Italy). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 50: 618-625.
- ANDERSON, R. S., GIAM, C. S., RAY, L. E., TRIPP, M. R. 1981. Effects of environmental pollutants on immunological competency of the clam *Mercenaria mercenaria*: impaired bacterial clearance. *Aquatic Toxicology* 1: 187-195.
- ANDERSON, R. S., OLIVER, L. M., JACOBS, D. 1992. Immunotoxicity of cadmium for the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Journal of Shellfish Research* 14: 317-326.
- ARAUJO, R., MORENO, D., RAMOS, M. A. 1993. The Asiatic clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) (Bivalvia: Corbiculidae) in Europe. *American Malacological Bulletin* 10: 39-49.
- AUFFRET, M., MUJZIC, N., CORPOREAU, C., MORAGA, D. 2002. Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Marine Environmental Research* 54: 585-589.
- BARFIELD, M. L., FARRIS, J. L., BLACK, M. C. 2001. Biomarker and bioaccumulation responses of Asian clams exposed to aqueous cadmium. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 63: 495-510.
- BASSERES, A., SIMONET, F., LAFONT, M., COSTE, M., NARBONNE, J.-F. 2004. Validation of biomarkers for impact evaluation of aqueous industrial waste in mesocosms. *Water Science and Technology* 49: 123-130.
- BAUDRIMONT, M., ANDRES, S., DURRIEU, G., BOUDOU, A. 2003. The key role of metallothioneins in the bivalve *Corbicula fluminea* during the depuration phase, after in situ exposure to Cd and Zn. *Aquatic Toxicology* 63: 89-102.

- BAUDRIMONT, M., METIVAUD, J., MAURY-BRACHET, R., RIBEYRE, F., BOUDOU, A. 1997. Bioaccumulation and metallothionein response in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 2096-2105.
- BAUMARD, P., BUDZINSKI, H., GARRIGUES, P. 1997. Analytical procedure for the analysis of PAHs in biological tissues by gas chromatography coupled to mass spectrometry: application to mussels. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 359: 502-509.
- BLAISE, C., TROTTIER, S., GAGNE, F., LALLEMENT, C., HANSEN, P. D. 2002. Immunocompetence of bivalve hemocytes as evaluated by miniaturized phagocytosis assay. *Environmental Toxicology*: 160-169.
- BRENNAN, R. J. and SCHIESTL, R. H. 1996. Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. *Mutation Research* 356: 171-178.
- BRITTON, J. C. and MORTON, B., 1977, *Corbicula* in North America: the evidence reviewed and evaluated. "Proceedings of the First International *Corbicula* Symposium" Fort Worth, Texas, Texas Christian University Research Foundation Publication, 249-287.
- BROUSSEAU, P., PELLERIN, J., MORIN, Y., CYR, D., BLAKLEY, B., BOERMANS, H., FOURNIER, M. 1999. Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following in vitro exposure to heavy metals. *Toxicology* 142: 145-156.
- CAJARAVILLE, M. P., ABASCAL, I., ETXEBERRIA, M., MARIGOMEZ, I. 1995a. Lysosomes as cellular markers of environmental pollution: time- and dose-dependent responses of the digestive lysosomal system of mussels after petroleum hydrocarbon exposure. *Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal* 10: 1-8.
- CAJARAVILLE, M. P., BEBIANNO, M. J., BLASCO, J., PORTE, C., SARASQUETE, C., VIARENGO, A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *The Science of The Total Environment* 247: 295-311.
- CAJARAVILLE, M. P., MARIGOMEZ, J. A., ANGULO, E. 1989. A stereological survey of lysosomal structure alterations in *Littorina littorea* exposed to 1-naphthol. *Comparative Biochemistry and Physiology* 93C: 231-237.
- CAJARAVILLE, M. P., MARIGOMEZ, J. A., ANGULO, E. 1991. Automated measurement of lysosomal structure alterations in oocytes of mussels exposed to petroleum hydrocarbons. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 21: 395-400.
- CAJARAVILLE, M. P., ROBLEDO, Y., ETXEBERRIA, M., MARIGOMEZ, I. 1995b. Cellular biomarkers as useful tools in the biological monitoring of environmental pollution: molluscan digestive lysosomes. In: Cajaraville, M. P. *Cell Biology in Environmental Toxicology*. Bilbao: University of the Basque Country. p 29-55.

- CANESI, L., CIACCI, C., BETTI, M., SCARPATO, A., CITTERIO, B., PRUZZO, C., GALLO, G. 2003. Effects of PCB congeners on the immune function of *Mytilus* hemocytes: alterations of tyrosine kinase-mediated cell signaling. *Aquatic Toxicology* 63: 293-306.
- CARDENAS, W., JENKINS, J. A., DANKERT, J. R. 2000. A flow cytometric approach to the study of crustacean cellular immunity. *Journal of Invertebrate Pathology* 76: 112-119.
- CHENG, T. C. 1981. Bivalves. In: Ratcliffe, N. A., Rowley, A. F. *Invertebrates blood cells - 1 - General aspects, animals without true circulatory systems to cephalopods*. London; New York; Toronto; Sydney; San Francisco: Academic Press. p 233-300.
- CIMA, F., BALLARIN, L., BRESSA, G., BURIGHEL, P. 1998. Cytoskeleton alterations by tributyltin (TBT) in tunicate phagocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 40: 160-165.
- CIUTAT, A. and BOUDOU, A. 2003. Bioturbation effects on cadmium and zinc transfers from a contaminated sediment and on metal bioavailability to benthic bivalves. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 1574-1581.
- DESOUKY, M., JUGDAOHSINGH, R., MCCROHAN, C. R., WHITE, K. N., POWELL, J. J. 2002. Aluminum-dependent regulation of intracellular silicon in the aquatic invertebrate *Lymnaea stagnalis*. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 99: 3394-3399.
- DEVIER, M. H., AUGAGNEUR, S., BUDZINSKI, H., MORA, P., NARBONNE, J. F., GARRIGUES, P. 2003. Microcosm tributyltin bioaccumulation and multibiomarker assessment in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 2679-2687.
- ETXEBERRIA, M., CAJARAVILLE, M. P., MARIGOMEZ, I. 1995. Changes in digestive cell lysosomal structure in mussels as biomarkers of environmental stress in the Urdaibai estuary (Biscay coast, Iberian peninsula). *Marine Pollution Bulletin* 30: 599-603.
- ETXEBERRIA, M., SASTRE, I., CAJARAVILLE, M. P., MARIGOMEZ, I. 1994. Digestive lysosome enlargement induced by experimental exposure to metals (Cu, Cd and Zn) in mussels collected from zinc-polluted site. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 27: 338-345.
- FOURNIER, M., PELLERIN, J., CLERMONT, Y., MORIN, Y., BROUSSEAU, P. 2001. Effects of *in vivo* exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes. *Toxicology* 161: 201-211.
- FRAYSSE, B., BAUDIN, J.-P., GARNIER-LAPLACE, J., ADAM, C., BOUDOU, A. 2002. Effects of Cd and Zn waterborne exposure on the uptake and depuration of ⁵⁷Co, ^{110m}Ag and ¹³⁴Cs by the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) and the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*)--whole organism study. *Environmental Pollution* 118: 297-306.
- GIAMBERINI, L. and CAJARAVILLE, M. P. 2005. Lysosomal responses in the digestive gland of the freshwater mussel, *Dreissena polymorpha*, experimentally exposed to cadmium. *Environmental Research* 98: 210-214.

- GIAMBERINI, L. and PIHAN, J. C. 1997. Lysosomal changes in the hemocytes of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* experimentally exposed to lead and zinc. *Diseases of Aquatic Organisms* 28: 221-227.
- GLINSKI, Z. and JAROSZ, J. 1997. Molluscan immune defenses. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Warsz)* 45: 149-155.
- GOMEZ-MENDIKUTE, A. and CAJARAVILLE, M. P. 2003. Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. *Toxicology in Vitro* 17: 539-546.
- HILLYER, J. F., SCHMIDT, S. L., CHRISTENSEN, B. M. 2003. Hemocyte-mediated phagocytosis and melanization in the mosquito *Armigeres subalbatus* following immune challenge by bacteria. *Cell Tissue Research* 313: 117-127.
- HOLM, P. E., ANDERSEN, S., CHRISTENSEN, T. H. 1995. Speciation of dissolved cadmium: Interpretation of dialysis, ion exchange and computer (GEOCHEM) methods. *Water Research* 29: 803-809.
- JEANTET, A. Y., BALLAN-DUFRANCAIS, C., MARTIN, J. L. 1985. Mechanisms of detoxication of cadmium by the oyster *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalve). II. Intracellular sites of accumulation of the metal in absorbant and excretory organs. *Compte-Rendu de l'Académie des Sciences III* 301: 177-182.
- KADAR, E., SALANKI, J., JUGDAOHSINGH, R., POWELL, J. J., MCCROHAN, C. R., WHITE, K. N. 2001. Avoidance responses to aluminium in the freshwater bivalve *Anodonta cygnea*. *Aquatic Toxicology* 55: 137-148.
- KOLLNER, B., WASSERRAB, B., KOTTERBA, G., FISCHER, U. 2002. Evaluation of immune functions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)--how can environmental influences be detected ? *Toxicology Letters* 131: 83-95.
- LABROT, F., NARBONNE, J.-F., VILLE, P., SAINT DENIS, M., RIBERA, D. 1999. Acute toxicity, toxicokinetics, and tissue target of lead and uranium in the clam *Corbicula fluminea* and the worm *Eisenia fetida*: comparison with the fish *Brachydanio rerio*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36: 167-178.
- L'AZOU, B., DUBUS, I., OHAYON-COURTES, C., LABOUYRIE, J.-P., PEREZ, L., POUVREAU, C., JUVET, L., CAMBAR, J. 2002. Cadmium induces direct morphological changes in mesangial cell culture. *Toxicology* 179: 233-245.
- LEFFEL, E. K., WOLF, C., POKLIS, A., WHITE, J., KIMBER L. 2003. Drinking water exposure to cadmium, an environmental contaminant, results in the exacerbation of autoimmune disease in the murine model. *Toxicology* 188: 233-250.
- LEKUBE, X., CAJARAVILLE, M. P., MARIGOMEZ, I. 2000. Use of polyclonal antibodies for the detection of changes induced by cadmium in lysosomes of aquatic organisms. *The Science of The Total Environment* 247: 201-212.

- LISS, M., CHAMPEAU, O., RIDDLE, M., SCHULZ, R., DUQUESNE, S. 2001. Combined effects of ultraviolet-B radiation and food shortage on the sensitivity of the Antarctic amphipod *Paramoera walkeri* to copper. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2088-2092.
- LIVINGSTONE, D. R. 1993. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 57: 195-211.
- LOOSE, L. D., SILKWORTH, J. B., CHARBONNEAU, T., BLUMENSTOCK, F. 1981. Environmental chemical-induced macrophage dysfunction. *Environmental Health Perspectives* 39: 79-91.
- LOWE, D. M. 1988. Alterations in cellular structure of *Mytilus edulis* resulting from exposure to environmental contaminants under field and experimental conditions. *Marine Ecology Progress Series* 46: 345-358.
- LOWE, D. M. and CLARKE, K. R. 1989. Contaminant-induced changes in the structure of the digestive epithelium of *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology* 15: 345-358.
- LOWE, D. M., MOORE, M. N., CLARKE, K. R. 1981. Effects of oil on digestive cells in mussels: quantitative alterations in cellular and lysosomal structure. *Aquatic Toxicology* 1: 213-226.
- LOWE, D. M., SOVERCHIA, C., MOORE, M. N. 1995. Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. *Aquatic Toxicology* 33: 105-112.
- MARIGOMEZ, I. and BAYBAY-VILLACORTA, L. 2003. Pollutant-specific and general lysosomal responses in digestive cells of mussels exposed to model organic chemicals. *Aquatic Toxicology* 64: 235-257.
- MARIGOMEZ, I., ORBEA, A., OLABARRIETA, I., ETXEBERRIA, M., CAJARAVILLE, M. P. 1996. Structural changes in the digestive lysosomal system of sentinel mussels as biomarkers of environmental stress in Mussel-Watch Programmes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 113C: 291-297.
- MARIGOMEZ, I., SOTO, M., CAJARAVILLE, M. P., ANGULO, E., GIAMBERINI, L. 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microscopy Research and Technique* 56: 358-392.
- MARIGOMEZ, J. A., CAJARAVILLE, M. P., ANGULO, E. 1990. Cellular cadmium distribution in the common winkle, *Littorina littorea* (L.) determined by X-ray microprobe analysis and histochemistry. *Histochemistry* 94: 191-199.
- MARIGOMEZ, J. A., VEGA, M. M., CAJARAVILLE, M. P., ANGULO, E. 1989. Quantitative responses of the digestive-lysosomal system of winkles to sublethal concentrations of cadmium. *Cellular and Molecular Biology* 35: 555-562.
- MATOZZO, V., BALLARIN, L., PAMPANIN, D. M., MARIN, M. G. 2001. Effects of copper and cadmium exposure on functional responses of hemocytes in the clam, *Tapes philippinarum*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 41: 163-170.

- MOORE, M. N. 1976. Cytochemical demonstration of latency of lysosomal hydrolases in digestive cells of the common mussel, *Mytilus edulis*, and changes induced by thermal stress. *Cell Tissue Research* 175: 279-287.
- NARBONNE, J.-F., DAUBEZE, M., CLERANDEAU, C., GUARRIGUES, P. 1999. Scale of classification based on biochemical markers in mussels: application to pollution monitoring in European coasts. *Biomarkers* 4: 415-424.
- RENWRANTZ, L. 1990. Internal defence system of *Mytilus edulis*. In: Stefano, G. B. *Studies in Neurosciences, Neurobiology of Mytilus edulis*. Manchester: Manchester University Press. p 256-275.
- SAUVE, S., BROUSSEAU, P., PELLERIN, J., MORIN, Y., SENEAL, L., GOUDREAU, P., FOURNIER, M. 2002. Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: *in vitro* exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquatic Toxicology* 58: 189-200.
- SIMKISS, K. and MASON, A. Z. 1983. Metals ions: metabolic and toxic effects. In: Hochachke, P. *The Mollusca*. New York: Academic Press.
- SOTO, M., CAJARAVILLE, M. P., ANGULO, E., MARIGOMEZ, I. 1996a. Autometallographic localization of protein-bound copper and zinc in the common winkle, *Littorina littorea*: a light microscopical study. *Histochemical Journal* 28: 689-701.
- SOTO, M., CAJARAVILLE, M. P., MARIGOMEZ, I. 1996b. Tissue and cell distribution of copper, zinc and cadmium in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*, determined by autometallography. *Tissue & Cell* 28: 557-568.
- SOTO, M., LEKUBE, X., MARIGOMEZ, I. 1999. Autometallographical localisation of Cu and Zn within target cell compartments of winkles following exposure to Cu&Zn mixtures. *European Journal of Histochemistry* 43: 323-334.
- TRAN, D., BOUDOU, A., MASSABUAU, J. C. 2001. How water oxygenation level influences cadmium accumulation pattern in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*: a laboratory and field study. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2073-2080.
- TRAN, D., CIRET, P., CIUTAT, A., DURRIEU, G., MASSABUAU, J. C. 2003. Estimation of potential and limits of bivalve closure response to detect contaminants: application to cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 914-920.
- UNEP/RAMOGÉ, 1999, Manual on the Biomarkers Recommended for the MED POL Biomonitoring Programme, UNEP,
- VIARENGO, A. and NOTT, J. A. 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology* 104C: 355-372.
- VICTOR, B. 1993. Responses of hemocytes and gill tissues to sublethal cadmium chloride poisoning in the crab *Paratelphusa hydrodromous* (Herbst). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 24: 432-439.

VIDAL, M. L., BASSERES, A., NARBONNE, J.-F. 2001. Potential biomarkers of trichloroethylene and toluene exposure in *Corbicula fluminea*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 9: 87-97.

VIDAL, M. L., BASSERES, A., NARBONNE, J.-F. 2002. Seasonal variations of pollution biomarkers in two populations of *Corbicula fluminea* (Müller). *Comparative Biochemistry and Physiology* 131C: 133-151.

VON GUNTEN, H. R., KARAMETAXAS, G., KRAHENBUHL, U., KUSLYS, M., GIOVANOLI, R., HOEHN, E., KEIL, R. 1991. Seasonal biogeochemical cycles in riverborne groundwater. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 55: 3597-3609.

WINTER, S. 1996. Cadmium uptake kinetics by freshwater mollusc soft body under hard and soft water conditions. *Chemosphere* 32: 1937-1948.

Parameters	df	F	p
Time	2	11.253	<0.0001 ^c
Dose	5	7.888	<0.0001 ^c
Time and Dose	10	4.498	<0.0001 ^c

F : F ratio ; df : degrees of freedom ; p : probability of F ; ^c Statistically significant ($P < 0.05$)

Table 1 : Two-way analysis of variance table showing the effects of time and dose of exposure on the phagocytosis activity.

Parameters ^a	F(T) ^b	df(T)	P(T)	F(D)	df(D)	P(D)	F(I)	df(I)	P(I)
Log(Vv)	12.518	2	<0.0001 ^c	9.598	5	<0.0001 ^c	4.088	10	<0.0001 ^c
Sv	9.861	2	<0.0001 ^c	8.906	5	<0.0001 ^c	2.773	10	<0.05 ^c
S/V	13.390	2	<0.0001 ^c	6.986	5	<0.0001 ^c	3.651	10	<0.001 ^c
Log(Nv)	1.257	2	0.287	4.228	5	0.001 ^c	3.173	10	<0.001 ^c

^a Vv : volume density ; Sv : surface density ; S/V : surface to volume ratio ; Nv : numerical density

^b F : F ratio ; df : degrees of freedom ; P : probability of F ; T : exposure time ; D : dose ; I : interaction between time and dose

^c Statistically significant ($P < 0.05$)

Table 2 : Two-way analysis of variance table showing the effect of exposure to different concentrations of cadmium on digestive lysosomal structure.

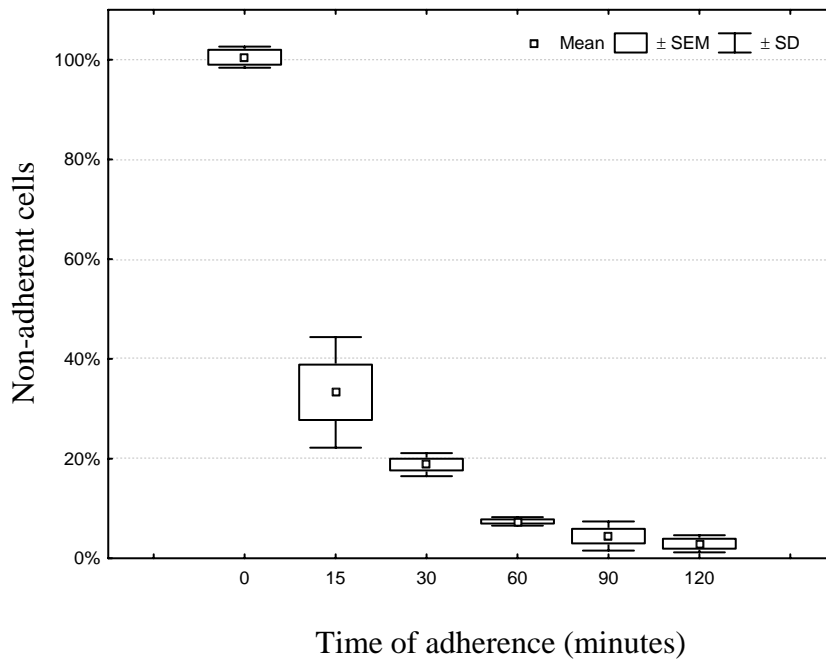


Figure 1 : Time of adherence of haemocytes to microplate wells. A volume of 100 μ l of haemolymph was added to the wells (in quadruplicate) and allowed to stand for different time periods. The haemolymph was collected for microscopic counting of non-adherent cells.

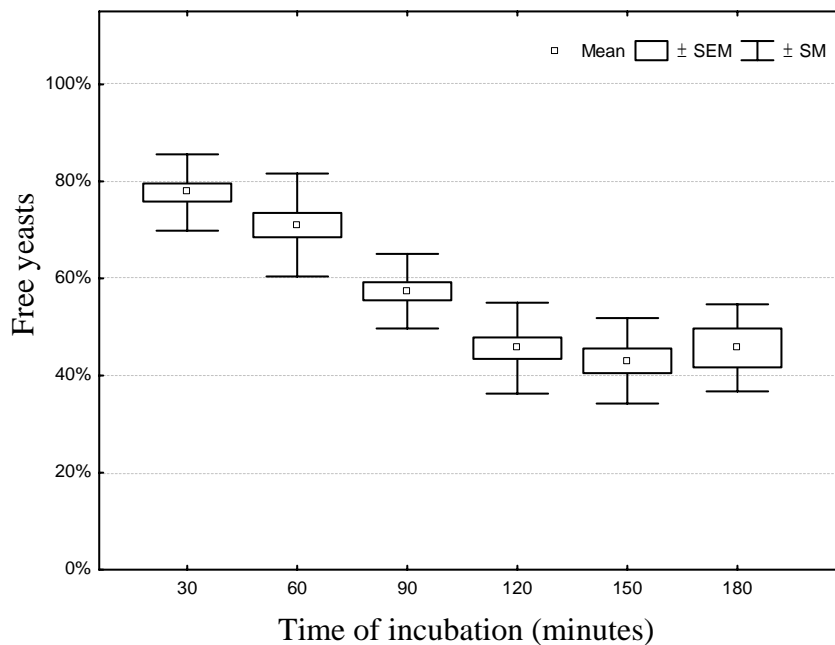


Figure 2 : Phagocytosis activity of the Asian clam haemocytes. The quantity of free beads left in solution during phagocytosis process is measured every 30 minutes. The data represent the mean, standard deviation, and error of n=4 replicates.

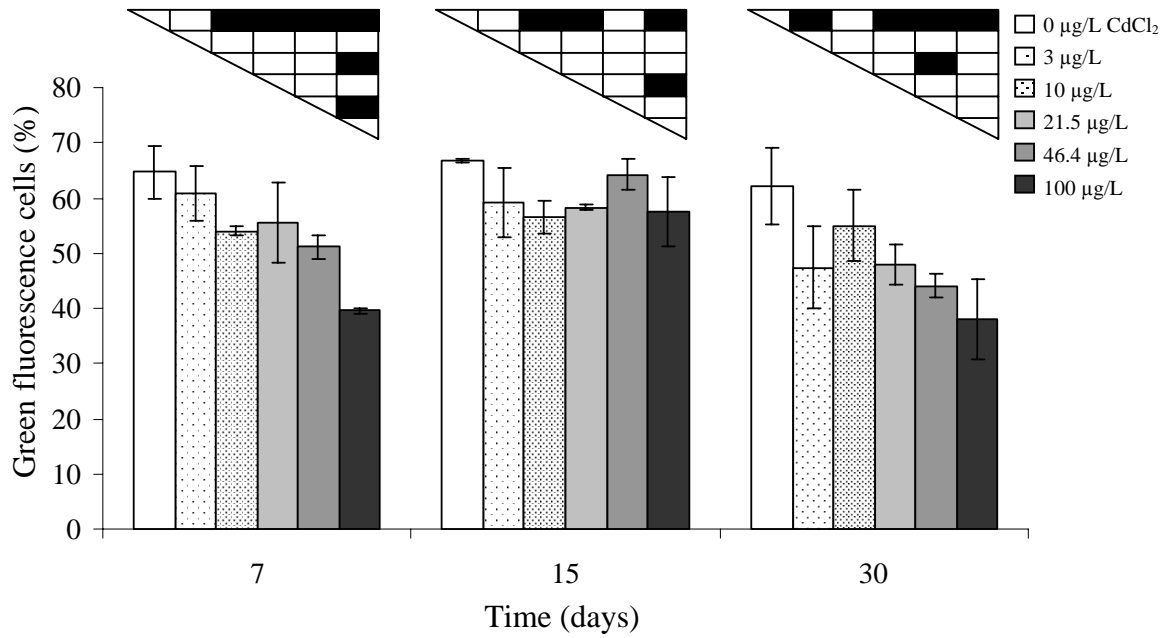


Figure 3 : Mean and standard deviation of the phagocytic activity of haemocytes. Significant differences ($P < 0.05$) between pairs of means are indicated by black squares in the upper triangular matrix.

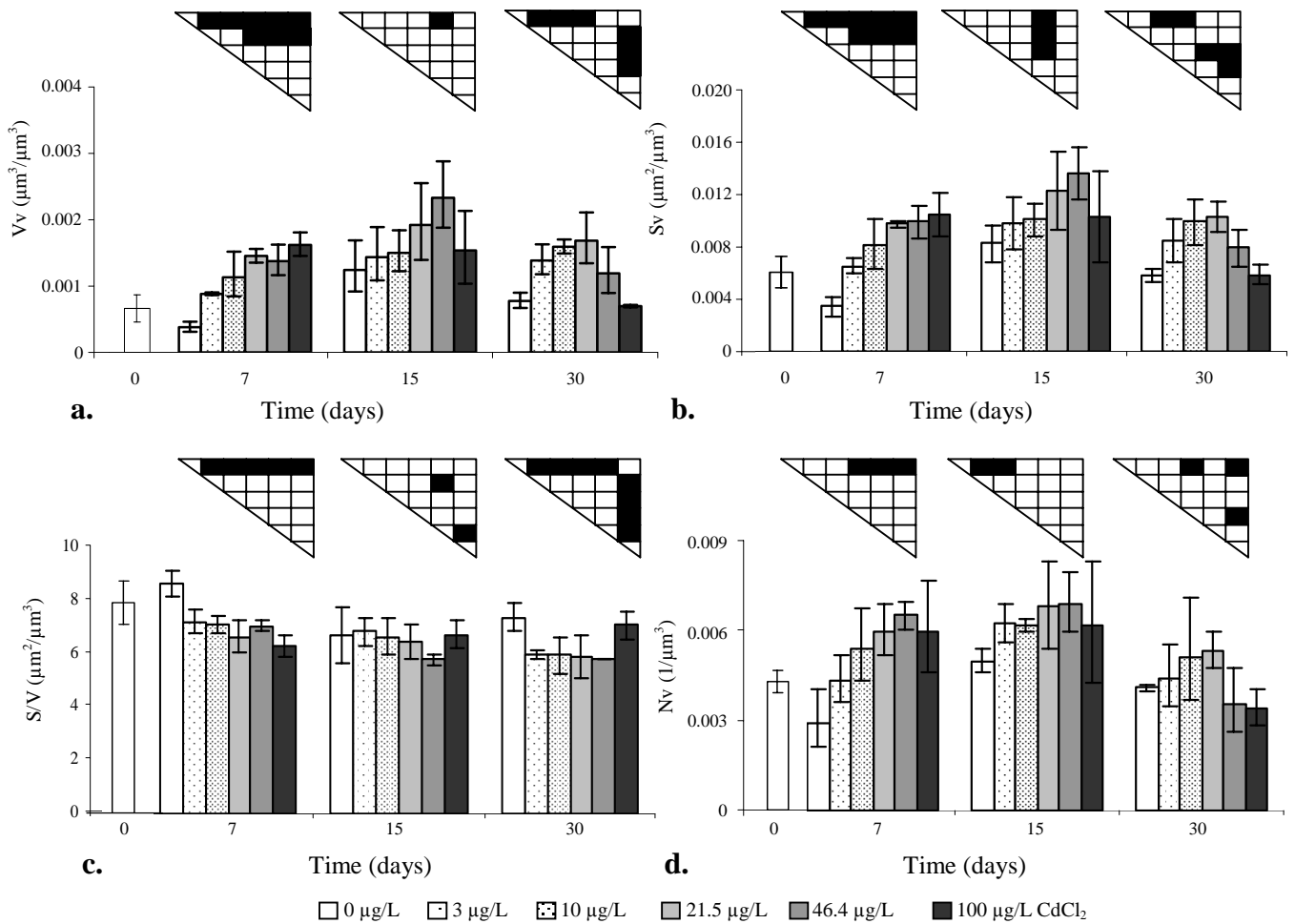


Figure 4 : Means and standard deviations of the stereological parameters analysis of digestive cells lysosomes in clams exposed to cadmium for 7, 15 and 30 days. **a.** lysosomal volume density (V_v), **b.** lysosomal surface density, **c.** lysosomal surface to volume ratio (S/V), **d.** lysosomal numerical density (N_v). Significant differences ($P < 0.05$) between pairs of mean values are indicated by black squares in the upper triangular matrix.

IV.A.2.1.a Autres marqueurs employés

- **La stabilité lysosomiale**

La cytochimie a déjà été appliquée dans l'évaluation de l'intégrité des lysosomes par la visualisation des enzymes hydrolytiques contenues dans le lysosome et a prouvé être un outil rapide et sensible pour l'évaluation des effets des xénobiotiques organiques et d'autres agents nocifs à de faibles concentrations intracellulaires (Merkow, *et al.*, 1968; Camus, *et al.*, 2000; Fernley, *et al.*, 2000). Cette réponse générale intervient dans tous les types cellulaires, depuis les champignons jusqu'aux vertébrés. Ce test peut donc potentiellement être largement appliqué à toutes les espèces. Cette méthode est basée sur l'évaluation de l'activité d'une enzyme lysosomiale, soit la N-acétyl- β -hexosaminidase soit la phosphatase acide. La déstabilisation se mesure par l'augmentation de perméabilité de la membrane des lysosomes en fonction du temps. La réactivité du substrat avec l'enzyme va colorer les lysosomes en mauve/rouge. La période moyenne de déstabilisation correspond à la moyenne des temps d'incubation dans un tampon acide qui va produire une réaction de coloration maximale. Plus le temps est court, plus les membranes des lysosomes sont instables et donc altérées. Cependant, comme le montre la Figure 31, les lysosomes ont une coloration très foncées. A ces grossissements, les lysosomes des tubules digestifs de *C. fluminea* sont trop petits pour pouvoir apprécier de façon visuelle une différence de coloration, et ce, quels que soient les différents temps d'incubation (0, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 et 90 minutes).

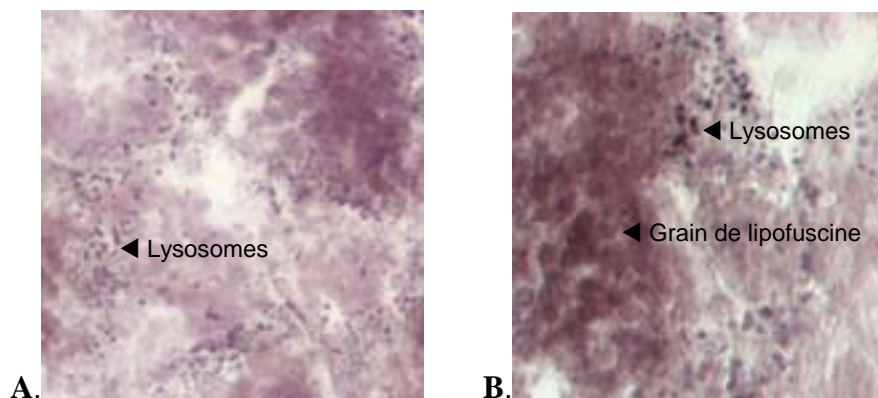


Figure 31 : Coupes de masses viscérales de *C. fluminea* pour la mesure de la stabilité lysosomiale. Réactions effectuées avec **A.** Hexosaminidase ($\times 500$), et **B.** Phosphatase acide ($\times 500$)

- **Le DNA unwinding**

Les valeurs $-\log F$ sont assez proches après 5 minutes et 40 minutes de lyse:

$$-\log F (5\text{min}) = 0,850$$

$$-\log F (40\text{min}) = 0,800$$

Il semble donc que même après seulement 5 minutes de lyse, la quantité d'ADN simple-brin soit trop élevée. Pour effectuer des comparaisons, le $-\log F$ doit être minimal chez les témoins. La mesure du DNA unwinding nécessiterait une mise au point complète afin de pouvoir être utilisée sur *C. fluminea* en complément des autres tests de génotoxicité. Ce test n'a plus été employé par la suite.

- **Mesure de la 8-oxo-7,8-dihydro-2' désoxyguanosine**

Le taux de 8-oxodG est un test spécifique d'un seul type de lésion. Pour cette mesure, nous avons utilisé 3 pools de 3 branchies pour chaque condition expérimentale. Les résultats sont présentés dans la Figure 32.

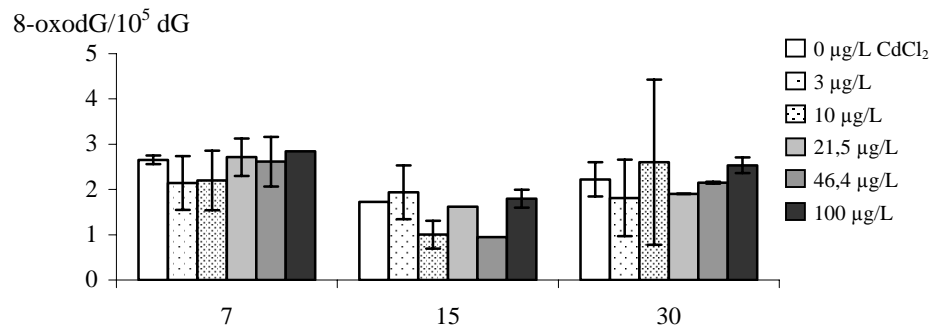


Figure 32 : Taux de 8-oxodG pour 10^5 dG, mesurés dans les branchies de *C. fluminea* exposées au cadmium.

Les taux de 8-oxodG ne sont indiqués ici qu'à titre indicatif pour illustrer une tendance. En effet, pour des raisons d'indisponibilité de certains produits, nous n'avons pas pu effectuer l'ensemble des mesures sur tous les échantillons et donc avoir suffisamment de données pour effectuer des statistiques. On peut cependant remarquer que les taux de 8-oxodG sont faibles. Après 7 jours d'exposition, il semble qu'il y ait une tendance à l'augmentation du taux de 8-oxodG en fonction de la dose, mais les résultats ne sont pas significatifs. Si les taux ne varient pas avec la dose, en revanche, ils semblent moins élevés après 15 jours d'exposition, pour remonter après 30 jours d'exposition.

Les valeurs de 8-oxodG sont relativement variables selon les auteurs, en fonction de la technique d'extraction de l'ADN utilisé (méthode avec phénol/chloroforme, méthode avec alcool isoamylique/chloroforme, méthode chaotrope, avec ou sans chélateur d'ion métallique, sous atmosphère d'azote...). Cependant, les taux d'oxydation que nous avons déterminés dans les branchies de *C. fluminea* sont plus proches des taux retrouvés chez un autre organisme d'eau douce, *Unio tumidus*, dont les taux les plus faibles d'oxydation ont été trouvés avec la méthode chaotrope (Tableau 10).

Espèces	Méthode d'extraction	Taux dans les branchies (8oxodG/10 ⁵ dG)	Référence
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Alcool isoamylique / chloroforme	6,6	(Akcha, <i>et al.</i> , 2000b)
	Chaotropique (NaI)	4,8	(Akcha, <i>et al.</i> , 2000a)
<i>Unio tumidus</i>	Alcool isoamylique / chloroforme	21,6	(Doyotte, A., 1998b)
	Chaotropique (NaI)	2,6	(Lemière, <i>et al.</i> , 2005)

Tableau 10 : Taux de 8-oxodG dans les branchies de deux bivalves sur des sites de référence, mesurés par chromatographie liquide haute pression couplée à un détecteur électrochimique.

La technique d'extraction de l'ADN utilisée ici, a fait l'objet de comparaisons avec d'autres techniques telles que la méthode chaotropique (au NaI) (ESCODD, 2000) ou à l'aide de kits (Qiagen, Promega). Dans notre cas, la méthode à l'alcool isoamylique/chloroforme semble la meilleure du point de vue quantitatif (plus d'ADN extrait) et qualitatif (élimination maximum des protéines) (Morin, *et al.*, 2003). De plus, les faibles taux d'oxydation rencontrés indiquent que l'oxydation artéfactuelle est limitée. Les résultats ne présentent pas cependant les mêmes tendances de réponses que celles des autres marqueurs. Des expérimentations menées chez les moules, à la fois en laboratoire et en milieu naturel, ont montré que pour des raisons expérimentales, ce marqueur donnait des réponses beaucoup plus satisfaisantes en milieu naturel (diminution du stress par rapport à l'expérimentation en aquarium) (Akcha, 2000).

IV.A.2.1.b Comparaison des réponses de la phagocytose : mesures en cytométrie de flux et avec lecteur de microplaques.

Après 30 jours d'exposition, nous avons comparé les 2 tests d'immunocompétence : La technique de mesure en cytomètre de flux et celle en microplaque, appliquée dans l'exposition *in vitro* des hémocytes au cadmium (Figure 33 et Figure 34).

Dans les 2 cas, la réponse indique la même tendance à une diminution de l'activité de phagocytose avec l'augmentation de la dose de cadmium. Ces deux types de tests peuvent donc s'appliquer pour la mesure de l'activité de phagocytose des hémocytes de *C. fluminea*.

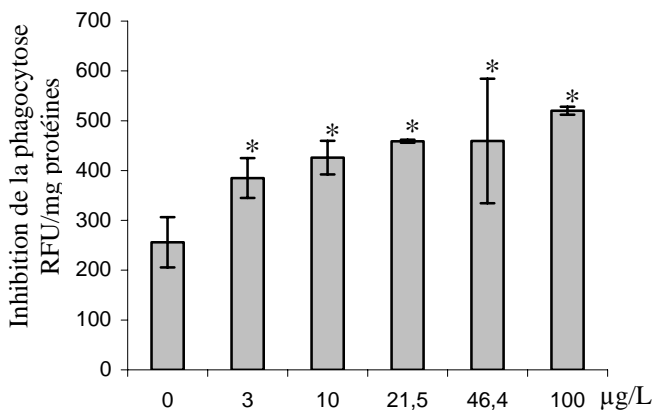


Figure 33 : Mesures en microplaque

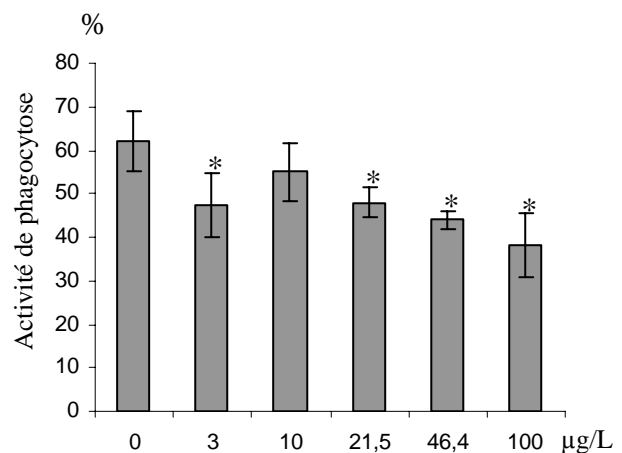


Figure 34 : Mesures en cytométrie en flux

L'avantage de la technique de cytométrie en flux permet une conservation des échantillons jusqu'à l'analyse. Cette technique est donc appropriée pour les prélèvements sur le terrain. Cependant, cet avantage est contrebalancé par le fait que les mesures s'effectuent une par une manuellement et que

l'appareillage nécessaire (cytomètre en flux) est très spécialisé et coûteux. La technique avec les levures semble plus appropriée pour les expérimentations en laboratoire. En effet, si celle-ci nécessite le traitement immédiat des hémocytes, elle permet d'effectuer une mesure rapide sur un grand nombre d'échantillons, en utilisant un appareillage plus répandu dans les laboratoires (lecteur de microplaques).

IV.A.2.1.c Conclusion de l'exposition en aquarium au cadmium

Cette exposition au cadmium nous a permis de déterminer quels sont les marqueurs dont l'application est réalisable sur un grand nombre d'échantillons avec des réponses facilement interprétables (activité de la phagocytose, changements structuraux des lysosomes). De plus, les marqueurs mesurés expriment la même tendance dans leurs réponses à l'exposition au cadmium, aussi bien pour la dose que pour le temps d'exposition. L'animal subit tout d'abord l'influence du cadmium, traduit par une première altération de ces fonctions. Ses systèmes de défense internes vont lui permettre alors de rétablir son milieu. Cependant, la conjonction de la contamination et de la mise à jeun forcée ne lui permettent pas de poursuivre son rétablissement, ses fonctions physiologiques s'en retrouvent altérées. Les réponses des marqueurs considérés traduisent l'évolution du statut physiologique de l'animal au cours de l'expérimentation.

IV.A.2.2 Expositions au tributyl-étain et au 17 β -œstradiol

Cette exposition a pour but de tester les effets d'un perturbateur endocrinien, le tributyl-étain (TBT) sur *C. fluminea* pour évaluer les paramètres des effets sur la quatrième grande fonction : la reprotoxicité. L'observation des coupes histologiques et la quantification des phosphates labiles en milieu alcalin permettra d'apprécier les modifications potentielles au niveau du système reproducteur. Cependant les paramètres mesurés en immunotoxicité et pour l'état général seront également appliqués. En effet, le système immunitaire et le système endocrinien peuvent s'influencer mutuellement (Figure 32) (Canesi, *et al.*, 2004).

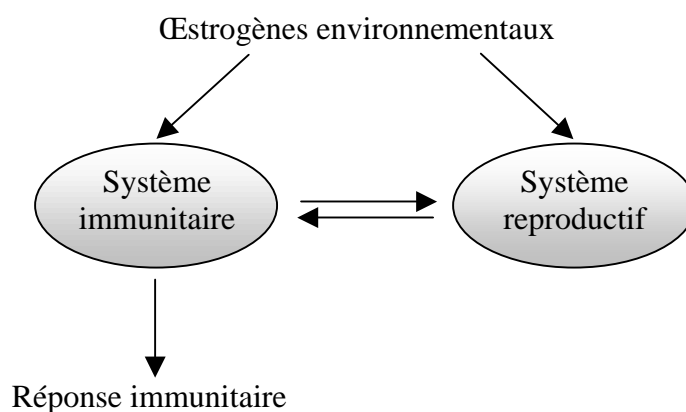


Figure 35 : Interactions bidirectionnelles entre le système endocrinien et le système immunitaire (Ahmed, 2000).

Une perturbation du système endocrinien par le TBT pourra se répercuter sur les défenses internes de l'organisme qui seront évaluées par le test d'inhibition de la phagocytose des hémocytes.

Le TBT regroupe à la fois les caractéristiques d'un composé métallique et d'un composé organique par ses groupements butyles (Figure 36) ; nous évaluerons les changements structuraux des lysosomes face à cette double caractéristique. Le TBT étant un androgène, favorisant la masculinisation, nous avons également effectué une comparaison avec un œstrogène, favorisant la féminisation, le 17 β -œstradiol (Figure 36).

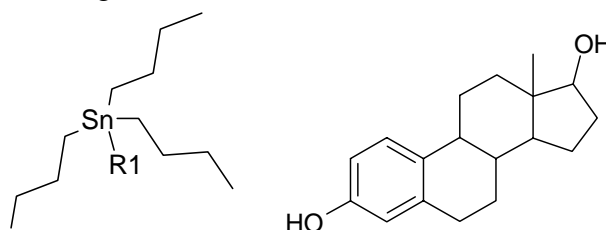


Figure 36 : Tributyl-étain et 17 β -œstradiol

Différents biomarqueurs ont été mesurés pour cette exposition, une partie des résultats est reportée dans l'article n°3. Les résultats obtenus en histologie et pour le dosage des phosphates labiles en milieu alcalin sont reportés à la suite.

ARTICLE 3

**Effects of tributyltin and 17 β -estradiol on immune and lysosomal systems of the Asian clam
Corbicula fluminea (M.)**

Olivier Champeau & Jean-François Narbonne

Soumis à *Environmental Toxicology and Pharmacology*

**Effects of tributyltin and 17 β -estradiol on immune and lysosomal systems of the Asian clam
Corbicula fluminea (M.)**

Olivier Champeau, Jean-François Narbonne*

LPTC Toxicologie Biochimique, Université de Bordeaux 1, UMR CNRS 5472, avenue des facultés,
33405 Talence cedex, France

*corresponding author (tel: +33.5.4000.8720; Fax: +33.5.4000.8719; E-mail: jf.narbonne@lptc.u-bordeaux1.fr)

Abstract

Freshwater clams *Corbicula fluminea* were experimentally exposed to a range of tributyltin (50, 250 and 500 ng Sn/L) and 17 β -estradiol (20, 200, 2000 ng/L) for 30 days. After 15 and 30 days, phagocytosis activity of haemocytes and lysosomal structural changes in the digestive cells were assayed. 17 β -estradiol exerted a higher inhibition on phagocytosis than tributyltin. This would suggest the existence of estrogen receptors, influencing the immune function. The stereological parameters measured for lysosomal structural changes in animals exposed to tributyltin varied as observed in other studies. Tributyltin is then depurated as other contaminants via digestive cell lysosomal compartment. This experiment emphasized a possible approach on the influence of endocrine disrupting compounds on a hermaphroditic species for environmental surveys.

Keywords : bivalve, phagocytosis activity, haemocytes, lysosomal enlargement

Introduction

A growing consideration has been observed in the past decade on endocrine disruptors. The origin of those compounds can be either anthropogenic (pesticides, industrial chemicals) or natural (soya). Endocrine disruption refers to the interference of endocrine system function by chemicals. Most of the attention has been given to the effects of endocrine disruptors on the reproductive status.

Some case of this type of action can be shown on organisms: such as birds (Halldin *et al.*, 1999; Bowerman *et al.*, 2000), reptiles (Crain and Guillette, 1998; Kester *et al.*, 2002), fishes (Batty and Lim, 1999; Harshbarger *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2001; Arukwe *et al.*, 2002; Hashimoto *et al.*, 2003; Toft *et al.*, 2003; van der Ven *et al.*, 2003) and molluscs (Gagné *et al.*, 2001; Aarab *et al.*, 2004; Quinn *et al.*, 2004). However, the potential detrimental effects on reproductive capacities have been in amphibians (Kloas *et al.*, 1999; Lutz and Kloas, 1999; Kloas, 2002), rodents (Iguchi *et al.*, 2002), marine mammals (Tanabe, 2002). In the present work, two different compounds: the anthropogenic tributyltin (TBT) and the natural 17 β -estradiol (E2).

TBT is used in industrial chemistry in the catalysis of organic synthesis, or stabilising agents for polymers, but it is mainly used as biocide in agriculture and wood industry. Its biocide property was found in 1950's, allowing the wide use of TBT as antifouling paints and in products for wood preservation. TBT is known to interfere with hormone metabolism (Yamabe *et al.*, 2000; Bech, 2002; Bech *et al.*, 2002; Axiak *et al.*, 2003; Chiavarini *et al.*, 2003). Beyond effects on hormone metabolism, TBT can perturbate the immune system as demonstrated in several species (Smialowicz *et al.*, 1990; Rice *et al.*, 1995; Békri and Pelletier, 2004). The main known perturbation induced by TBT is its androgenic effect leading to male imposex in various species (Gibbs *et al.*, 1991; Barreiro *et al.*, 2001; Penchaszadeh *et al.*, 2001; Power and Keegan, 2001; Horiguchi *et al.*, 2002). On the contrary, estrogens like estradiol cause feminization. The action of estradiol and other estrogeno-mimetic endocrine disrupting compounds are predominantly mediated by intracellular estrogens receptors. Estrogens are not merely reproductive hormones, they can also affect the functioning of several non-reproductive tissues (Morey *et al.*, 1997; Mendelsohn, 2000; Haynes *et al.*, 2002) including the immune system (Stefano and Peter, 2001; Vegeto *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2002; Calemine *et al.*, 2003). It has long been suspected that there is a strong interaction between sex hormones and the immune system.

Analysis have shown that endocrine disruptors can be found in waste-, ground- and river waters before reaching the marine environment (Fatoki and Vernon, 1990; Yamamoto *et al.*, 2001; Fromme *et al.*, 2002; Hashimoto *et al.*, 2005). So far, the effects of such compounds on freshwater ecosystems have been poorly investigated compared research on the marine species (Czech *et al.*, 2001; Gauthier-Clerc, S. *et al.*, 2002; Hill *et al.*, 2002; Hutchinson, 2002; Hutchinson and Pickford, 2002; Etchian and Pellerin, 2003). Therefore, little is known about the ecological implications of exposure to such endocrine modulating compounds in freshwater ecosystems.

The Asian clam *Corbicula fluminea*, a freshwater bivalve mollusc, is widely distributed in rivers and lakes (Britton and Morton, 1982; Araujo *et al.*, 1993). As a filter-feeding organism, in contact both with water and sediment, the clam may be exposed to several types of contaminants and is known to accumulate them (Tatem, 1986; Narbonne *et al.*, 1999; Baudrimont *et al.*, 2003). Its cells may then undergo higher concentration exposure leading to enhanced effects of contaminants including endocrine disruption.

The list of compounds in the environment that mimic or block endogenous estrogens is expanding at an alarming rate. Since the immune and reproductive systems may interfere in a bidirectional pattern, an altered immune system can indirectly impact on the reproductive health. Therefore, evaluation of the immune status ought to be routinely included in the toxicological assessment of estrogenic chemicals. The objective of this study was to determine the effects of TBT and 17 β -estradiol, known to have consequences in the environment, on a freshwater bivalve by measuring

their influence on haemocytes phagocytosis activity and to observe lysosomal changes in digestive cells as depuration compartment.

Materials and methods

Animals collection

Adults *Corbicula fluminea* (M.) were collected from the Dordogne river, between Beynac-et-Cazenac and La Roque-Gageac (Aquitaine, France). They were kept in aerated ISO water 48h at 18°C prior to the experiment. The ISO water is a standard for *Danio rerio* assays. This water was chosen in order to avoid any contaminations or interactions by/with compounds coming from tap water.

Experimental design

Forty animals were placed in each test aquaria containing 5L of ISOwater. Clams were not fed and were held under a natural light cycle. Aeration was provided continuously by air bubbling. Dead clams were removed to avoid water fouling.

TBT and 17 β -estradiol (E2) were diluted in methanol as vehicle solvent to obtain nominal final concentrations of 50, 250 and 500 ng Sn /L for TBT and 20, 200, 2000 ng/L for 17 β -estradiol corresponding to molar concentrations of 0.42, 2.1 and 4.2 nM as Sn and 0.07, 0.7 and 7 nM as E2 in water; each aquarium receiving an identical quantity of vehicle solvent. Two controls were made, one with only water and the second with methanol. All exposures were conducted in duplicate. Water of each aquarium was replaced every day with fresh and aerated water with chemicals added according to the treatment to avoid any loss in contaminants concentrations (Porte *et al.*, 2001). Freshly-made water was cooled down to exposure room temperature and to oxygenate 24 h before water change. Physico-chemicals parameters of the water were monitored every day during the experiment with a Universal Pocket Meter Multiline P4 WTW instruments (Wissenschaftlich Technische Werkstätten, Weilheim, Germany). The mean water temperature was 17.8 ± 0.4 °C, the mean pH 7.7 ± 0.2 , the mean dissolved O₂ was 8.7 ± 0.9 mg/L, NO₂⁻ was less than 0.005 mg/L and NH₄⁺ was less than 0.02 mg/L Accordingly, water quality was regarded to be suitable for maintaining the test organisms.

Biomarker measurement

Six individuals were sampled for each assay (cell viability and phagocytosis) and 4 measurements were made for each individual. Haemolymph was withdrawn from the anterior adductor muscle through a notch in the shell with a 26-gauge needle. 100 μ L of haemolymph were added to each of 96 wells of polystyrene microplates. Haemocytes were allowed to adhere to the bottom of the wells for 90 min. at room temperature in the dark. Cell viability and phagocytosis assay were then performed.

Neutral red is a supravital dye that accumulates in lysosomes of living cells. Cell uptake is believed to occur by passive diffusion across the plasma membrane. The neutral red stock solution (Lowe *et al.*, 1995) was made by dissolving 20 mg of dye (C.I.50040, Sigma) in 1 mL of dimethyl sulphoxide (DMSO) (Sigma) and the working solution was prepared by diluting 10 μ l of the stock solution with 5 mL of phosphate buffered saline (PBS) adapted for freshwater molluscs (KH₂PO₄ 2.3 mM, Na₂HPO₄ 3.8 mM, NaCl 8.5 mM, KCl 10 mM, pH 7.5 with osmolality adjusted to 50 mOsm). Haemocytes were rinsed with PBS and 100 μ l of the working solution was added to each well. Haemocytes were exposed to neutral red for 3 h to allow uptake of the dye (Babich and Borenfreund, 1993). The cells were then washed twice with PBS and the dye was extracted from lysosomes using a solution of 1% glacial acetic acid, 50% ethanol (v/v). After 20 min at 4°C, the plates were transferred to a microplate reader (BioTek FL600). A differential absorbency at 540 nm against 630 nm was recorded. Data are expressed as percentage of control response.

Inhibition of haemocytes phagocytosis activity was determined by a microplate-based fluorescence measurement method (Blaise *et al.*, 2002). The haemolymph was removed and the wells washed once with PBS. Then, 100 μ L of fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled yeast were added to the wells and left to incubate for 2h at room temperature in the dark. Just before taking the fluorescence readings, wells were washed twice with PBS and 0.1 mg/L of trypan blue was added for quenching during 15 minutes at 4°C in the dark. Fluorescence was measured at 485 nm excitation and 520 nm emission with a microplate reader (BioTek FL600). Afterward, haemocytes were washed once with PBS to remove trypan blue and cell proteins assessment was made with Lowry method (Lowry *et al.*, 1951) by adding first NaOH to allow cell digestion. Phagocytosis activity was expressed as relative fluorescence unit per milligram of cell proteins (RFU/mg proteins).

To assess the lysosomal structural changes, five visceral mass from freshly dissected animals were frozen in *n*-hexane at -70°C for 45 seconds (UNEP/RAMOGÉ, 1999) and kept in liquid nitrogen until required. For analysis, visceral masses were embedded in Jung's Tissue Freezing Medium and cut at 8 μ m thick in a cryostat (Microm HM 500, Zeiss) with a cabinet temperature of -20°C. Sections were then collected onto warm glass slides and stored at -70°C until required for staining.

The cytochemical reaction for b-glucuronidase was demonstrated as in (Moore, 1976) with modifications (Cajaraville *et al.*, 1989). Osmolarity of the different experimental media and incubation time were adapted to freshwater organisms. Briefly, polyvinyl alcohol at 20% (w/v) concentration was used as colloid stabiliser, incubations were carried out at pH 4.5 and 37°C for 30 min and, after post-coupling with Fast Garnet GBC and fixation in Baker's formaldehyde calcium, sections were counterstained with a 0.1% aqueous solution of Fast Green FCF for 10 min.

A stereological procedure was applied in order to quantify the structure of the digestive cell lysosomes in clams, with the aid of an automated image analysis system (*Biological Measurement System* – (Sevisan™, Spain)). The system, previously described in detail (Cajaraville *et al.*, 1991), calculates the following parameters: lysosomal volume density ($V_v=V_L/V_C$), lysosomal surface density ($S_v=SL/V_C$), lysosomal surface to volume ratio ($S/V=SL/V_L$) inversely referred to the size of lysosomes and lysosomal numerical density ($N_v=NL/V_C$) where V, volume; S, surface; N, number; L, lysosomes; C, digestive cell cytoplasm (Lowe *et al.*, 1981). The sample size was determined based on previous analyses on the stabilisation of mean and standard deviation values of the four parameters (Etxeberria *et al.*, 1995; Marigómez and Baybay-Villacorta, 2003).

Data analysis

All statistical evaluations were performed using Statistica software (6.0, Statsoft). Data fulfilling normal distribution and homogeneity of variance were submitted to a multivariate analysis with “contaminant” and “time” as the independent variables.

Data were first tested for normality and analysis of variances were performed with the Levene test. Effects were considered significant at the 95% confidence level ($P<0.05$). Differences in the evolution of immunotoxic effects biomarkers with respect to control group between contaminated groups were determined using a MANOVA. Tukey test was used as post hoc test to compare ($P<0.05$) together contaminated groups with respect to the control one.

For the stereological parameters on lysosomal responses, significant differences between paired means were determined using the Duncan's multiple range comparison data. Data for lysosomal V_v and N_v were logarithmically transformed before statistical analysis.

Results

Cell viability

The neutral red assay, used to measure the cells viability during exposure to TBT (figure 2A) and 17 β -estradiol (figure 2B), indicates that there is no cytotoxicity for most of the tested concentrations. However although there are no significant differences compared to control, cells viability in animals exposed seem to be slightly lower than in control.

Phagocytosis

The phagocytosis activity does not change between animals exposed to water or methanol (figure 3) after 15 days. However, the phagocytosis is significantly different between animals exposed to water and the one exposed to methanol after 30 days of exposure (figure 3). The inhibition of the phagocytosis is more important in animals exposed to methanol. However, the variations due to methanol in exposed animals can be neglected as they all received the same amount of vehicle solvent.

Phagocytosis activity of clam haemocytes does not exert any difference with control after 15 days of exposure to TBT (figure 4A). But the exposure to the highest concentration of E2, namely 2000 ng/L, (figure 4B) reduces significantly ($P < 0.05$) the phagocytosis activity compared to control.

After 30 days of exposure, the phagocytic activity of haemocytes of animals exposed to TBT (figure 5A) seems to be inhibited as the dose of TBT increases. However, only the phagocytic activity of haemocytes from animals exposed to the highest dose of TBT are significantly reduced compared to control.

With E2 (figure 5B), inhibition of phagocytosis occurs with both medium (200 ng/L) and high (2000 ng/L) concentrations, while exposure to 20 ng/L of E2 does not affect significantly phagocytosis.

For both compounds, the inhibition of the phagocytosis increases with the duration of exposure.

Lysosomal changes

During the experiment, two controls were made to assess the possible impact of the vehicle solvent on stereological parameters. Results are reported in figure 6. No significant differences are found between water and methanol with the stereological parameters. It can thus be considered that methanol does not influence significantly the stereological parameters during the exposure.

For TBT, the two-way analysis of variance (table 1) indicates only a significant effect of TBT concentration on Vv (in log), Sv and Nv (in log) and on the same parameters with the interaction of time and concentration. For the E2, the two-way analysis of variance (table 1) indicated only a significant effect of time on Vv (in log), Sv and Nv (in log) and of concentration on Sv and Nv (in log).

After 15 days to 50 ng Sn/L only lysosomal volume density (Vv), surface density (Sv) and numerical density (Nv) decrease significantly. After 30 days, there is an increase in Vv, Sv and Nv and a decrease of S/V in animals exposed to 250 and 500 ng Sn/L but only Vv, Sv and Nv of animals exposed to 500 ng Sn/L TBT are significantly different from control.

After 15 days to 2000 ng/L of E2 Vv and Sv significantly increase. After 30 days of exposure, there are no significant variations of the four stereological parameters. Between 15 and 30 days of exposure, Vv, Sv and Nv significantly decrease ($P < 0.05$) for all E2 concentrations and for control.

Discussion

TBT and 17 β -estradiol showed statistically significant changes in the responses of phagocytosis. TBT reduced phagocytosis activity only after 30 days of exposure at 500 ng Sn/L. The phagocytosis activity of animals exposed to 17 β -estradiol was reduced as soon as 15 days at 2000 ng/L and after 30 days at 200 ng/L and 2000 ng/L.

Most of the available information concerning the immunotoxicity of organotin compounds, mainly inhibition of phagocytosis, has been obtained from aquatic organisms. The in vivo exposure to TBT

of the blue mussel, *Mytilus edulis*, reduced significantly haemocytes phagocytic activity from 40 ng Sn/L (0.33 nM) (St Jean *et al.*, 2002). The effective concentration reducing phagocytosis in *Tapes philippinarum* was found to be at 50 nM (Cima *et al.*, 1998). (Bouchard *et al.*, 1999) have shown that *in vitro* exposures of haemocytes of *Mya arenaria* to TBT inhibited phagocytotic uptake of latex fluospheres from 1 μ M. In oyster haemocytes, TBT has been found to decrease chemiluminescence activity (used as a measure of phagocytotic activity) at a concentration of 1.5 μ M (Fisher *et al.*, 1990). Compared with other species, the effective concentration of TBT able to reduce phagocytosis (4.2 nM Sn) in *Corbicula fluminea* is low. However, the mechanism of TBT effects on phagocytosis is not clear yet. The effects observed in the freshwater snail *Lymnea stagnalis* did not appear to be associated with endocrine modulating activity but rather appeared to have resulted from the cytotoxic or inflammatory activity of TBT (Czech *et al.*, 2001).

The main effects on phagocytosis activity have been observed after 17 β -estradiol exposure. The bidirectional interactions between the endocrine system and the immune system have been noted. For example, gonadal hormones have been shown to have a marked effect on the morphology of thymus and other lymphoid organs (Ahmed, 2000). This implies that the modulation of the reproductive tissues by environmental estrogens may also affect the immune system. Conversely, the modulation of the immune system by environmental estrogens, either directly or indirectly, may in turn affect reproductive physiology (Ahmed, 2000).

Estradiol can act in several ways on haemocytes; it can induce an increase in Ca²⁺ concentration, modifying haemocytes capacity to phagocyte (Canesi, L. *et al.*, 2004a). 17 β -estradiol can affect the immune function of the marine mussel, through rapid tyrosine kinase-mediated signalling pathways converging on phosphorylation of both mitogen activated protein kinases (MAPKs) and signal transducers and activators of transcription (STATs), whose activation plays a key role in the immune response (Canesi, Laura *et al.*, 2004b). Hormones can then play a role in phagocytic activity of haemocytes and estradiol can act as feed back control process (Gauthier-Clerc, Sophie, 2003). Impairment of immune response leads to a loss of competitiveness in the environment.

Phagocytosis normally mobilizes lysosomes for subsequent handling of phagocytosed materials (Bayne, 1990). Lysosomes are involved in sequestration and metabolism of natural toxins, likely to induce several patterns of lysosomal damage (Lowe and Pipe, 1994; Cajaraville *et al.*, 1995).

A few variations among lysosomal stereological parameters were observed. The most important modifications observed occurred when animals were exposed to TBT. When stored in lysosomes, organic xenobiotics and metals may cause their membrane destabilization (Lowe and Pipe, 1994; St Jean *et al.*, 2002), or their structural changes (Cajaraville *et al.*, 1991; Cajaraville *et al.*, 1992; Etxeberría *et al.*, 1994). Digestive cell lysosomes are involved in the process of TBT excretion as butyltins which are mainly accumulated in pyloric caeca (Békri and Pelletier, 2004). Butyltins are known to be strong membrane toxicants (Gray *et al.*, 1987; Aw *et al.*, 1990) and the membrane affinity and toxicity of TBT has been clearly demonstrated in human erythrocytes (Porvaznik *et al.*, 1986).

In the present work, after 30 days of experiment, stereological parameters decreased in control animals. As the clams were not fed, we could expect an effect of food privation on digestive cells. However, the increase in Vv, Sv and Nv observed for animal exposed to TBT indicated that impacts of TBT on lysosomes compartment is stronger than the one induced by starvation. The increase observed stereological parameters in animals exposed to 17 β -estradiol may be due the activity of β -glucuronidase. This activity is likely to be enhanced by the presence of steroid such as 17 β -estradiol (Sanchez-Martin *et al.*, 1996). The increase in the number of lysosomes observed in our study may be a consequence of the β -glucuronidase production and activity. The steroid may have also affected lysosomal membrane by modifying ion balance within cell (Burlando *et al.*, 2002).

As with phagocytosis activity, lysosomal structural changes occurred after 30 days of exposure. With the exposure to 17 β -estradiol lysosomal parameters might go down due to the combination of

exposure to 17 β -estradiol and to starvation, inducing a very high stress for digestive cells; the decrease between 15 and 30 days of exposure is significant.

In conclusion, in an animal such as *Corbicula fluminea*, presenting hermaphroditism characteristics, the immune and lysosomal responses may be influenced by endocrine disruptors. In the present experiment, both TBT and E2 act on the immune function of haemocytes, E2 modifying the phagocytic activity earlier than TBT. Lysosomes underwent endocrine disruptor impact. Response of the lysosomal compartement towards TBT is the same as for other metal pollutant such as cadmium, inducing an increase in number of lysosomes. E2 does not have any strong effect on this compartement as this product is a natural hormon entering in a normal metabolizing process. However, the compartement is still affected. This study suggest that if E2 affects immune system, as an hermaphroditic protandrous species, receptor for this steroid may exist.

Acknowledgements

This work was part of a PhD work granted by TOTAL. Investigations on stereological parameters were performed in the laboratory of Pr. M.P. Cajaraville and supported by a grant to consolidated research groups of the University of the Basque Country. The authors wish also to thank Dr. S. Lemaire-Gony for her review.

References

- Aarab, N., Minier, C., Lemaire, S., Unruh, E., Hansen, P.-D., Larsen, B.K., Andersen, O.-K., Narbonne, J.-F., 2004. Biochemical and histological responses in mussel (*Mytilus edulis*) exposed to North Sea oil and to a mixture of North Sea oil and alkylphenols. *Mar. Environ. Res.* 58, 437-441.
- Ahmed, S.A., 2000. The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disruptors): a new emerging field. *Toxicology* 150, 191-206.
- Araujo, R., Moreno, D., Ramos, M.A., 1993. The Asiatic clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) (Bivalvia: Corbiculidae) in Europe. *Am. Malacol. Bull.* 10, 39-49.
- Arukwe, A., Kullman, S.W., Berg, K., Goksoyr, A., Hinton, D.E., 2002. Molecular cloning of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggshell zona radiata protein complementary DNA: mRNA expression in 17beta-estradiol- and nonylphenol-treated fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 132B, 315-326.
- Aw, T.Y., Nicotera, P., Manzo, L., Orrenius, S., 1990. Tributyltin stimulates apoptosis in rat thymocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 283, 46-50.
- Axiak, V., Micallef, D., Muscat, J., Vella, A., Mintoff, B., 2003. Imposex as a biomonitoring tool for marine pollution by tributyltin: some further observations. *Environ. Int.* 28, 743-749.
- Babich, H., Borenfreund, E., 1993. Applications of the neutral red cytotoxicity assay to risk assessment of aquatic contaminants: an overview. In: Landis, W.G., Hughes, J.S., Lewis, M.A. (Eds.), *Environmental Toxicology and Risk Assessment*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, p. 215-229.
- Barreiro, R., Gonzalez, R., Quintela, M., Ruiz, J.M., 2001. Imposex, organotin bioaccumulation and sterility of female *Nassarius reticulatus* in polluted areas of NW Spain. *Mar. Ecol. - Prog. Ser.* 218, 203-212.
- Batty, J., Lim, R., 1999. Morphological and reproductive characteristics of male mosquitofish (*Gambusia affinis holbrooki*) inhabiting sewage-contaminated waters in New South Wales, Australia. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 301-307.
- Baudrimont, M., Andres, S., Durrieu, G., Boudou, A., 2003. The key role of metallothioneins in the bivalve *Corbicula fluminea* during the depuration phase, after in situ exposure to Cd and Zn. *Aquat. Toxicol.* 63, 89-102.
- Bayne, C.J., 1990. Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates: phagocytosis appears to be an ancient line of defense. *Bioscience* 40, 723-731.
- Bech, M., 2002. Imposex and tributyltin contamination as a consequence of the establishment of a marina, and increasing yachting activities at Phuket Island, Thailand. *Environ. Pollut.* 117, 421-429.

- Bech, M., Strand, J., Jacobsen, J.A., 2002. Development of imposex and accumulation of butyltin in the tropical muricid *Thais distinguenda* transplanted to a TBT contaminated site. *Environ. Pollut.* 119, 253-260.
- Békri, K., Pelletier, É. 2004. Trophic transfer and in vivo immunotoxicological effects of tributyltin (TBT) in polar seastar *Leptasterias polaris*. *Aquat. Toxicol.* 66, 39-53.
- Blaise, C., Trottier, S., Gagné, F., Lallement, C., Hansen, P.D., 2002. Immunocompetence of bivalve hemocytes as evaluated by miniaturized phagocytosis assay. *Environ. Toxicol.*, 160-169.
- Bouchard, N., Pelletier, É., Fournier, M., 1999. Effects of butyltin compounds on phagocytic activity of hemocytes from three marine bivalves. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 519-522.
- Bowerman, W.W., Best, D.A., Grubb, T.G., Sikarskie, J.G., Giesy, J.P., 2000. Assessment of environmental endocrine disruptors in bald eagles of the Great Lakes. *Chemosphere* 41, 1569-1574.
- Britton, J.C., Morton, B., 1982. A dissection guide, field and laboratory manual for the introduced bivalve *Corbicula fluminea*. In: Burch, J.B., White-Rudolph, J. (Eds.), *Malacol. Rev.* Niwot, Colorado, p. 82.
- Brown, R.P., Greer, R.D., Mihaich, E.M., Guiney, P.D., 2001. A critical review of the scientific literature on potential endocrine-mediated effects in fish and wildlife. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49, 17-25.
- Burlando, B., Marchi, B., Panfoli, I., Viarengo, A., 2002. Essential role of Ca²⁺-dependent phospholipase A2 in estradiol-induced lysosome activation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283, C1461-1468.
- Cajaraville, M.P., Marigómez, J.A., Angulo, E., 1989. A stereological survey of lysosomal structure alterations in *Littorina littorea* exposed to 1-naphthol. *Comp. Biochem. Physiol.* 93C, 231-237.
- Cajaraville, M.P., Marigómez, J.A., Angulo, E., 1991. Automated measurement of lysosomal structure alterations in oocytes of mussels exposed to petroleum hydrocarbons. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 21, 395-400.
- Cajaraville, M.P., Uranga, J.A., Angulo, E., 1992. Comparative effects of the water accommodated fraction of three oils on mussels - 3. Quantitative histochemistry of enzymes related to the detoxication metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.* 103C, 369-377.
- Cajaraville, M.P., Robledo, Y., Etxeberria, M., Marigómez, I., 1995. Cellular biomarkers as useful tools in the biological monitoring of environmental pollution: molluscan digestive lysosomes. In: Cajaraville, M.P. (Eds.), *Cell Biology in Environmental Toxicology*. University of the Basque Country, Bilbao, p. 29-55.
- Calemine, J., Zalenka, Z., Karpuzoglu-Sahin, E., Ward, D.L., Lengi, A., Ahmed, S.A., 2003. The immune system of geriatric mice is modulated by estrogenic endocrine disruptors (diethylstilbestrol, (Alpha, *et al.*)-zearalanol, and genistein): Effects on interferon-[gamma]. *Toxicology* 194, 115-128.

- Canesi, L., Ciacci, C., Betti, M., Lorusso, L.C., Marchi, B., Burattini, S., Falcieri, E., Gallo, G., 2004a. Rapid effects of 17beta-estradiol on cell signaling and function of *Mytilus* hemocytes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 136, 58-71.
- Canesi, L., Lorusso, L.C., Ciacci, C., Betti, M., Zampini, M., Gallo, G., 2004b. Environmental estrogens can affect the function of mussel hemocytes through rapid modulation of kinase pathways. *Gen. Comp. Endocrinol.* 138, 58-69.
- Chiavarini, S., Massanisso, P., Nicolai, P., Nobili, C., Morabito, R., 2003. Butyltins concentration levels and imposex occurrence in snails from the Sicilian coasts (Italy). *Chemosphere* 50, 311-319.
- Cima, F., Marin, M.G., Matozzo, V., Da Ros, L., Ballarin, L., 1998. Immunotoxic effects of organotin compounds in *Tapes philippinarum*. *Chemosphere* 37, 3035-3045.
- Crain, D.A., Guillette, L.J., Jr., 1998. Reptiles as models of contaminant-induced endocrine disruption. *Anim. Reprod. Sci.* 53, 77-86.
- Czech, P., Weber, K., Dietrich, D.R., 2001. Effects of endocrine modulating substances on reproduction in the hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis* L. *Aquat. Toxicol.* 53, 103-114.
- Etchian, O.A., Pellerin, J., 2003. Characterization of aspartate transcarbamylase activity from gonads of the soft shell clam, *Mya arenaria*. *Comp. Biochem. Physiol.* 134B, 615-629.
- Etcheberria, M., Sastre, I., Cajaraville, M.P., Marigómez, I., 1994. Digestive lysosome enlargement induced by experimental exposure to metals (Cu, Cd and Zn) in mussels collected from zinc-polluted site. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 27, 338-345.
- Etcheberria, M., Cajaraville, M.P., Marigómez, I., 1995. Changes in digestive cell lysosomal structure in mussels as biomarkers of environmental stress in the Urdaibai estuary (Biscay coast, Iberian peninsula). *Mar. Pollut. Bull.* 30, 599-603.
- Fatoki, O.S., Vernon, F., 1990. Phthalate esters in river of the Greater Manchester area, U.K. *Sci. Tot. Environ.* 95, 227-232.
- Fisher, W.S., Wishkovski, A., Chu, F.E., 1990. Effect of tributyltin on defense-related activities of oyster hemocytes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19, 354-360.
- Fromme, H., Küchler, T., Otto, T., Pilz, K., Müller, J., Wenzel, A., 2002. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Res.* 36, 1429-1438.
- Gagné, F., Blaise, C., Salazar, M., Salazar, S., Hansen, P.D., 2001. Evaluation of estrogenic effects of municipal effluents to the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Comp. Biochem. Physiol.* 128C, 213-225.
- Gauthier-Clerc, S., Pellerin, J., Blaise, C., Gagne, F., 2002. Delayed gametogenesis of *Mya arenaria* in the Saguenay fjord (Canada): a consequence of endocrine disruptors? *Comp. Biochem. Physiol.* 131C, 457-467.

- Gauthier-Clerc, S., 2003. Activité vitellogénique et stéroïdienne chez *Mya arenaria* (mollusque bivalve) durant la gamétogenèse et en réponse à une exposition au 17 β -oestradiol. Thèse de Doctorat, Université de Nantes - Facultés des Sciences Pharmaceutiques, 240 pages
- Gibbs, P.E., Pascoe, P.L., Bryan, G.W., 1991. Tributyltin-induced imposex in stenoglossan gastropods: pathological effects on the female reproductive system. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C, 231-235.
- Gray, B.H., Porvaznik, M., Flemming, C., Lee, L.H., 1987. tri-n-Butyltin: a membrane toxicant. *Toxicology* 47, 35-54.
- Guo, Z., Krucken, J., Benten, W.P., Wunderlich, F., 2002. Estradiol-induced nongenomic calcium signaling regulates genotropic signaling in macrophages. *J. Biol. Chem.* 277, 7044-7050.
- Halldin, K., Berg, C., Brandt, I., Brunstrom, B., 1999. Sexual behavior in Japanese quail as a test end point for endocrine disruption: effects of in ovo exposure to ethinylestradiol and diethylstilbestrol. *Environ. Health Perspect.* 107, 861-866.
- Harshbarger, J.C., Coffey, M.J., Young, M.Y., 2000. Intersexes in Mississippi River shovelnose sturgeon sampled below Saint Louis, Missouri, USA. *Mar. Environ. Res.* 50, 247-250.
- Hashimoto, S., Kurihara, R., Strussmann, C.A., Yamasaki, T., Soyano, K., Hara, A., Shiraishi, H., Morita, M., 2003. Gonadal histology and serum vitellogenin levels of bigeye tuna *Thunnus obesus* from the Northern Pacific Ocean--absence of endocrine disruption bio-indicators. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 459-465.
- Hashimoto, S., Horiuchi, A., Yoshimoto, T., Nakao, M., Omura, H., Kato, Y., Tanaka, H., Kannan, K., Giesy, J.P., 2005. Horizontal and vertical distribution of estrogenic activities in sediments and waters from Tokyo Bay, Japan. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 209-216.
- Haynes, M.P., Li, L., Russell, K.S., Bender, J.R., 2002. Rapid vascular cell responses to estrogen and membrane receptors. *Vascul. Pharmacol.* 38, 99-108.
- Hill, M., Stabile, C., Steffen, L.K., Hill, A., 2002. Toxic effects of endocrine disrupters on freshwater sponges: common developmental abnormalities. *Environ. Pollut.* 117, 295-300.
- Horiguchi, T., Kojima, M., Kaya, M., Matsuo, T., Shiraishi, H., Morita, M., Adachi, Y., 2002. Tributyltin and triphenyltin induce spermatogenesis in ovary of female abalone, *Haliotis gigantea*. *Mar. Environ. Res.* 54, 679-684.
- Hutchinson, T.H., 2002. Reproductive and developmental effects of endocrine disrupters in invertebrates: in vitro and in vivo approaches. *Toxicol. Lett.* 131, 75-81.
- Hutchinson, T.H., Pickford, D.B., 2002. Ecological risk assessment and testing for endocrine disruption in the aquatic environment. *Toxicology* 181-182, 383-387.
- Iguchi, T., Watanabe, H., Katsu, Y., Mizutani, T., Miyagawa, S., Suzuki, A., Kohno, S., Sone, K., Kato, H., 2002. Developmental toxicity of estrogenic chemicals on rodents and other species. *Congenit. Anom. Kyoto* 42, 94-105.

- Kester, M.H., Bulduk, S., van Toor, H., Tibboel, D., Meinl, W., Glatt, H., Falany, C.N., Coughtrie, M.W., Schuur, A.G., Brouwer, A., Visser, T.J., 2002. Potent inhibition of estrogen sulfotransferase by hydroxylated metabolites of polyhalogenated aromatic hydrocarbons reveals alternative mechanism for estrogenic activity of endocrine disruptors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 1142-1150.
- Kloas, W., Lutz, I., Einspanier, R., 1999. Amphibians as a model to study endocrine disruptors: II. Estrogenic activity of environmental chemicals in vitro and in vivo. *Sci. Total Environ.* 225, 59-68.
- Kloas, W., 2002. Amphibians as a model for the study of endocrine disruptors. *Int. Rev. Cytol.* 216, 1-57.
- Lowe, D.M., Moore, M.N., Clarke, K.R., 1981. Effects of oil on digestive cells in mussels: quantitative alterations in cellular and lysosomal structure. *Aquat. Toxicol.* 1, 213-226.
- Lowe, D.M., Pipe, R.K., 1994. Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study. *Aquat. Toxicol.* 30, 357-365.
- Lowe, D.M., Soverchia, C., Moore, M.N., 1995. Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. *Aquat. Toxicol.* 33, 105-112.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-273.
- Lutz, I., Kloas, W., 1999. Amphibians as a model to study endocrine disruptors: I. Environmental pollution and estrogen receptor binding. *Sci. Total Environ.* 225, 49-57.
- Marigómez, I., Baybay-Villacorta, L., 2003. Pollutant-specific and general lysosomal responses in digestive cells of mussels exposed to model organic chemicals. *Aquat. Toxicol.* 64, 235-257.
- Mendelsohn, M.E., 2000. Nongenomic, ER-mediated activation of endothelial nitric oxide synthase: how does it work? What does it mean? *Circ. Res.* 87, 956-960.
- Moore, M.N., 1976. Cytochemical demonstration of latency of lysosomal hydrolases in digestive cells of the common mussel, *Mytilus edulis*, and changes induced by thermal stress. *Cell Tissue Res.* 175, 279-287.
- Morey, A.K., Pedram, A., Razandi, M., Prins, B.A., Hu, R.M., Biesiada, E., Levin, E.R., 1997. Estrogen and progesterone inhibit vascular smooth muscle proliferation. *Endocrinology* 138, 3330-3339.
- Narbonne, J.F., Djomo, J.E., Ribera, D., Ferrier, V., Garrigues, P., 1999. Accumulation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed to sediment by the mollusk *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 42, 1-8.
- Penchaszadeh, P.E., Averbuj, A., Cledon, M., 2001. Imposex in gastropods from Argentina (South-Western Atlantic). *Mar. Pollut. Bull.* 42, 790-791.
- Porte, C., Solé, M., Borgh, V., Martinez, M., Chamoro, J., Torreblanca, A., Ortiz, M., Orbea, A., Soto, M., Cajaraville, M.P., 2001. Chemical, biochemical and cellular responses in the digestive

- gland of the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Spanish Mediterranean coast. *Biomarkers* 6, 335-350.
- Porvaznik, M., Gray, B.H., Mattie, D., Jackson, A.G., Omlor, R.E., 1986. The ultrastructural localization of tri-n-butyltin in human erythrocyte membranes during shape transformation leading to hemolysis. *Lab. Invest.* 54, 254-267.
- Power, A.J., Keegan, B.F., 2001. The significance of imposex levels and TBT contamination in the Red Whelk, *Neptunea antiqua* (L.) from the offshore Irish Sea. *Mar. Pollut. Bull.*, 9.
- Quinn, B., Gagné, F., Costello, M., McKenzie, C., Wilson, J., Mothersill, C., 2004. The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquat. Toxicol.* 66, 279-292.
- Rice, C.D., Banes, M.M., Ardelt, T.C., 1995. Immunotoxicity in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, following acute exposure to tributyltin. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 28, 464-470.
- Sanchez-Martin, M.M., Cabezas-Delamare, M.J., Cabezas, J.A., 1996. Increased levels of several lysosomal enzymes in sera from women using oral contraceptives. *Clin. Chim. Acta* 255, 173-181.
- Smialowicz, R.J., Riddle, M.M., Rogers, R.R., Leubke, R.W., Copeland, C.B., Ernst, G.G., 1990. Immune alterations in rats following subacute exposure to tributyltin oxide. *Toxicology* 64, 169-178.
- St Jean, S.D., Pelletier, É., Courtenay, S.C., 2002. Hemocyte functions and bacterial clearance affected in vivo by TBT and DBT in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol. - Prog. Ser.* 236, 163-178.
- Stefano, G.B., Peter, D., 2001. Cell surface estrogen receptors coupled to cNOS mediate immune and vascular tissue regulation: therapeutic implications. *Med. Sci. Monit.* 7, 1066-1074.
- Tanabe, S., 2002. Contamination and toxic effects of persistent endocrine disrupters in marine mammals and birds. *Mar. Pollut. Bull.* 45, 69-77.
- Tatem, H.E., 1986. Bioaccumulation of polychlorinated biphenyls and metals from contaminated sediment by freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii* and clams, *Corbicula fluminea*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 15, 171-183.
- Toft, G., Edwards, T.M., Baatrup, E., Guillette, L.J., Jr., 2003. Disturbed Sexual Characteristics in Male Mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) from a Lake Contaminated with Endocrine Disruptors. *Environ. Health Perspect.* 111, 695-701.
- UNEP/RAMOGGE, 1999. Manual on the Biomarkers Recommended for the MED POL Biomonitoring Programme. UNEP. p.
- van der Ven, L.T., Wester, P.W., Vos, J.G., 2003. Histopathology as a tool for the evaluation of endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 908-913.

Vegeto, E., Bonincontro, C., Pollio, G., Sala, A., Viappiani, S., Nardi, F., Brusadelli, A., Viviani, B., Ciana, P., Maggi, A., 2001. Estrogen prevents the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in microglia. *J. Neurosci.* 21, 1809-1818.

Yamabe, Y., Hoshino, A., Imura, N., Suzuki, T., Himeno, S., 2000. Enhancement of androgen-dependent transcription and cell proliferation by tributyltin and triphenyltin in human prostate cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 169, 177-184.

Yamamoto, T., Yasuhara, A., Shiraishi, H., Nakasugi, O., 2001. Bisphenol A in hazardous waste landfill leachates. *Chemosphere* 42, 415-418.

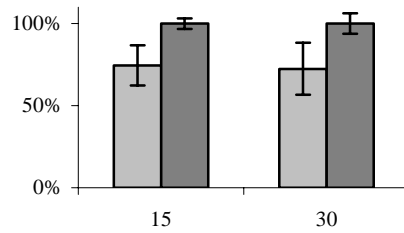


Figure 1 : Means and standard deviations of cell viability of animals exposed in only water and with methanol as solvent vehicle for 15 and 30 days.

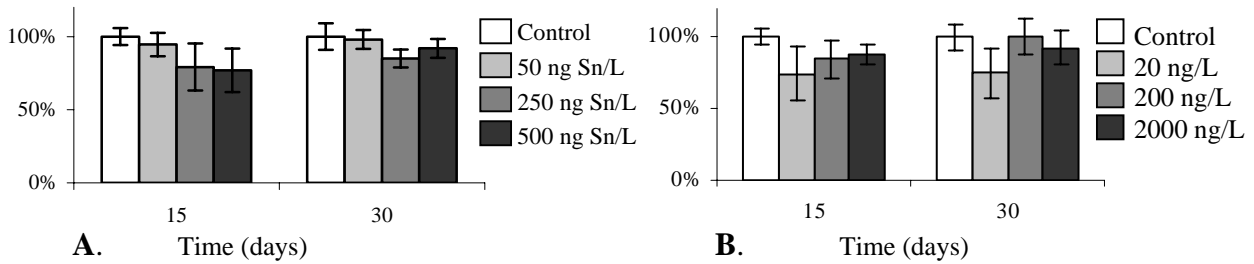


Figure 2 : Cell viability of animals exposed 15 and 30 days to TBT (A) and 17β-estradiol (B) (means ± standard deviation)

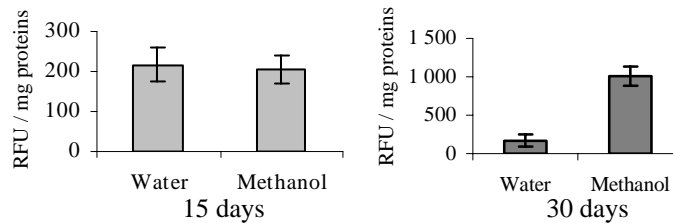


Figure 3 : Means and standard deviations of phagocytosis inhibition (as relative fluorescence units (RFU)/mg of proteins) of animals in water and with methanol as solvent vehicle for 15 and 30 days.

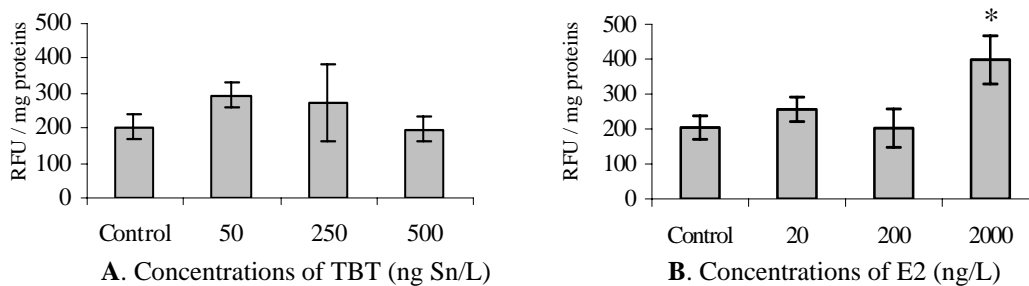


Figure 4 : Inhibition of phagocytosis (as relative fluorescence units (RFU)/mg of proteins) after 15 days of exposure to TBT (A) and 17β-estradiol (B) (means ± standard deviation)

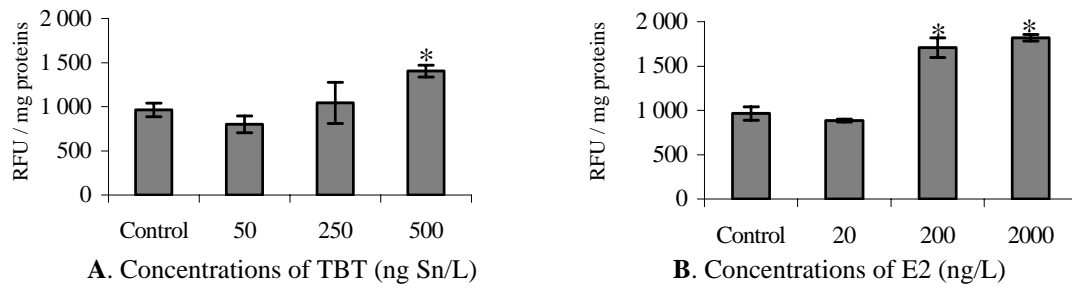


Figure 5 : Inhibition of phagocytosis after 30 days of exposure to TBT (A) and 17β-estradiol (B) (means ± standard deviation of the relative fluorescence units / mg of proteins)

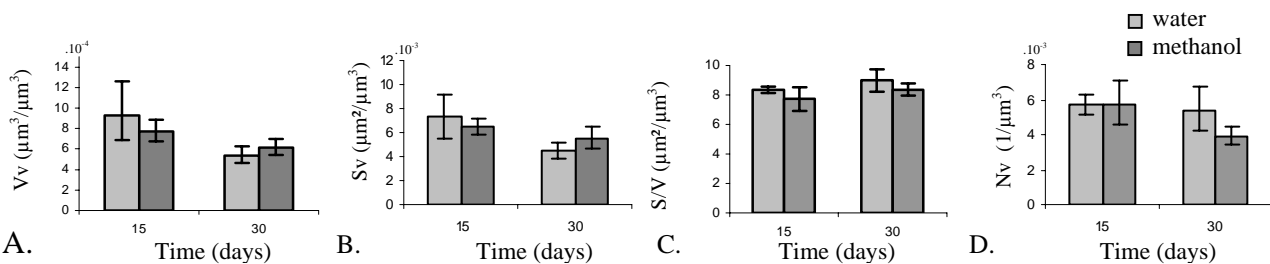


Figure 6 : Means and standard deviations of stereological parameters measured in digestive cells of animals exposed in only water and with methanol as solvent vehicle for 15 and 30 days. **A.** lysosomal volume density (Vv), **B.** lysosomal surface density (Sv), **C.** lysosomal surface to volume ratio (S/V), **D.** lysosomal numerical density (Nv).

TBT	F (T)	df	p	F (D)	df	p	F (I)	df	p
Log (Vv)	0.192	1	0.665	5.443	3	0.004	4.779	3	0.008
Sv	0.098	1	0.756	4.875	3	0.007	4.429	3	0.011
S/V	0.605	1	0.443	0.711	3	0.553	1.300	3	0.292
Log(Nv)	0.061	1	0.806	5.216	3	0.005	3.102	3	0.041

E2	F (T)	df	p	F (D)	df	p	F (I)	df	p
Log (Vv)	18.709	1	0.0002	1.809	3	0.170	0.794	3	0.508
Sv	19.1508	1	0.0002	2.9893	3	0.049	1.094	3	0.369
S/V	2.715	1	0.111	0.538	3	0.661	0.340	3	0.796
Log(Nv)	15.48	1	0.001	4.81	3	0.009	0.812	3	0.499

Vv : volume density ; Sv : surface density ; S/V : surface to volume ratio ; Nv : numerical density
 F : Fisher's F ratio ; df : degrees of freedom ; p : probability of F ; T : exposure time ; D : exposure dose ; I : time×dose
 Statistically significant ($P < 0.05$)

Table 1 : Two-way analysis of variance table showing the effect of exposure to concentrations of TBT and E2 in digestive lysosomal structure.

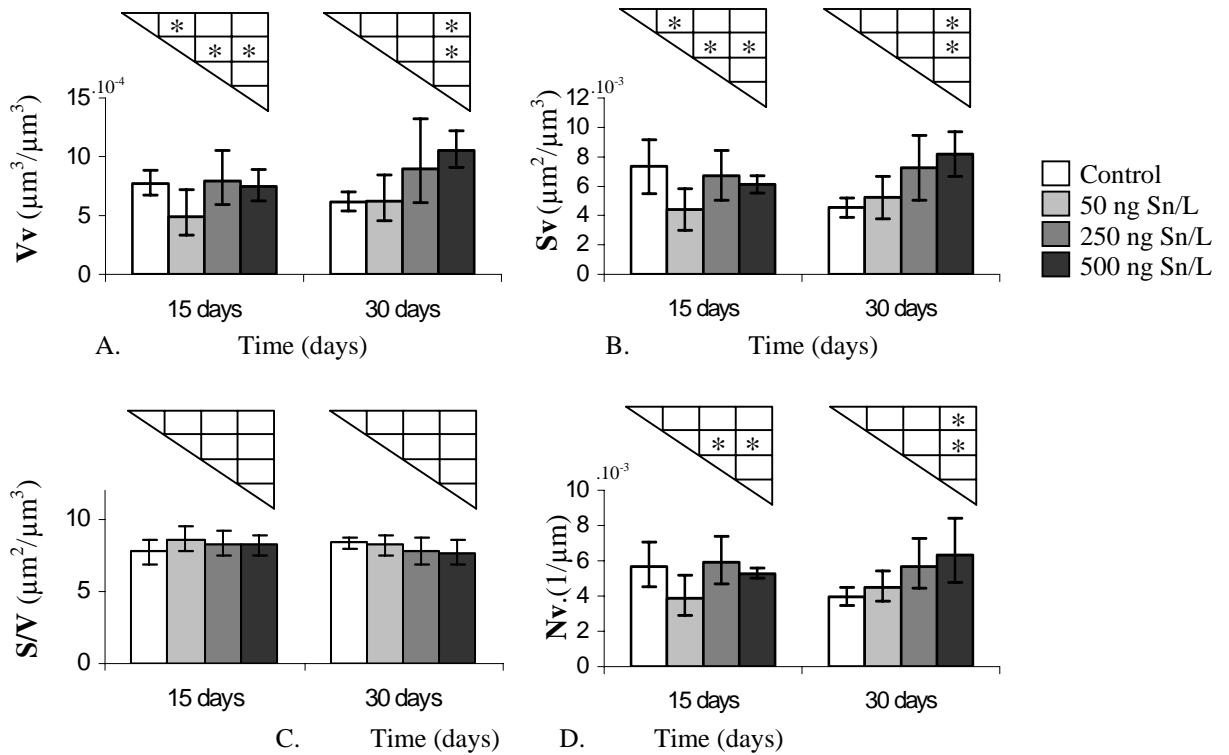


Figure 7 : Means and standard deviations of the stereological parameters analysis of digestive lysosomes in clams exposed to TBT for 15 and 30 days. **A.** lysosomal volume density (Vv), **B.** lysosomal surface density, **C.** lysosomal surface to volume ratio (S/V), **D.** lysosomal numerical density (Nv). Significant differences between pairs of mean values are indicated in the upper triangular matrix by an asterisk ($P < 0.05$).

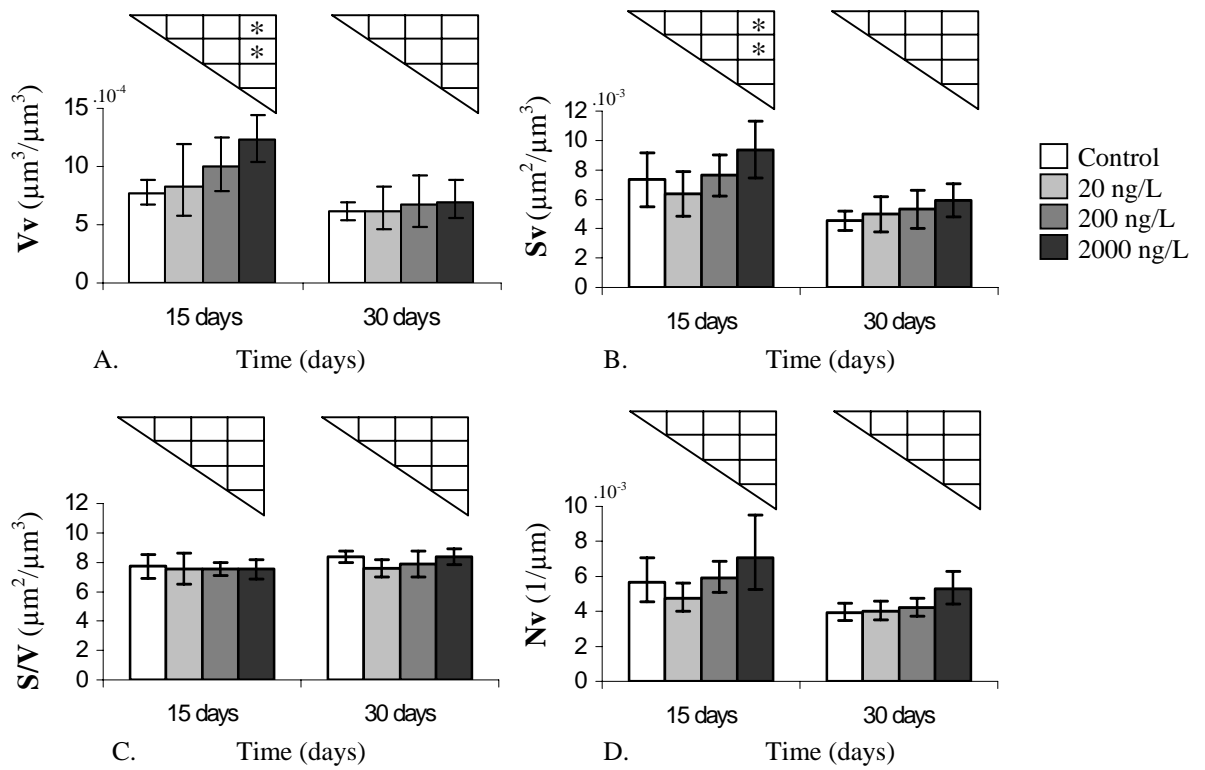


Figure 8 : Means and standard deviations of the stereological parameters analysis of digestive lysosomes in clams exposed to 17β-estradiol for 15 and 30 days. **A.** lysosomal volume density (Vv), **B.** lysosomal surface density, **C.** lysosomal surface to volume ratio (S/V), **D.** lysosomal numerical density (Nv). Significant differences between pairs of mean values are indicated in the upper triangular matrix by an asterisk ($P < 0.05$).

IV.A.2.2.a Autres marqueurs employés

- **Dosage des phosphates labiles en milieu alcalin**

Sur tous les tissus prélevés (masse viscérale, manteau, branchies) aucune coloration, indiquant la présence de nombreux groupements phosphates, n'a pu être observée.

- **Histologie**

Nous avons effectué des coupes histologiques dans les masses viscérales de *C. fluminea* (n=3) afin de contrôler l'état des gonades après exposition au 17β -œstradiol et au TBT, et évaluer leurs effets éventuels sur l'hermaphroditisme. Les résultats sont présentés dans la Figure 37.

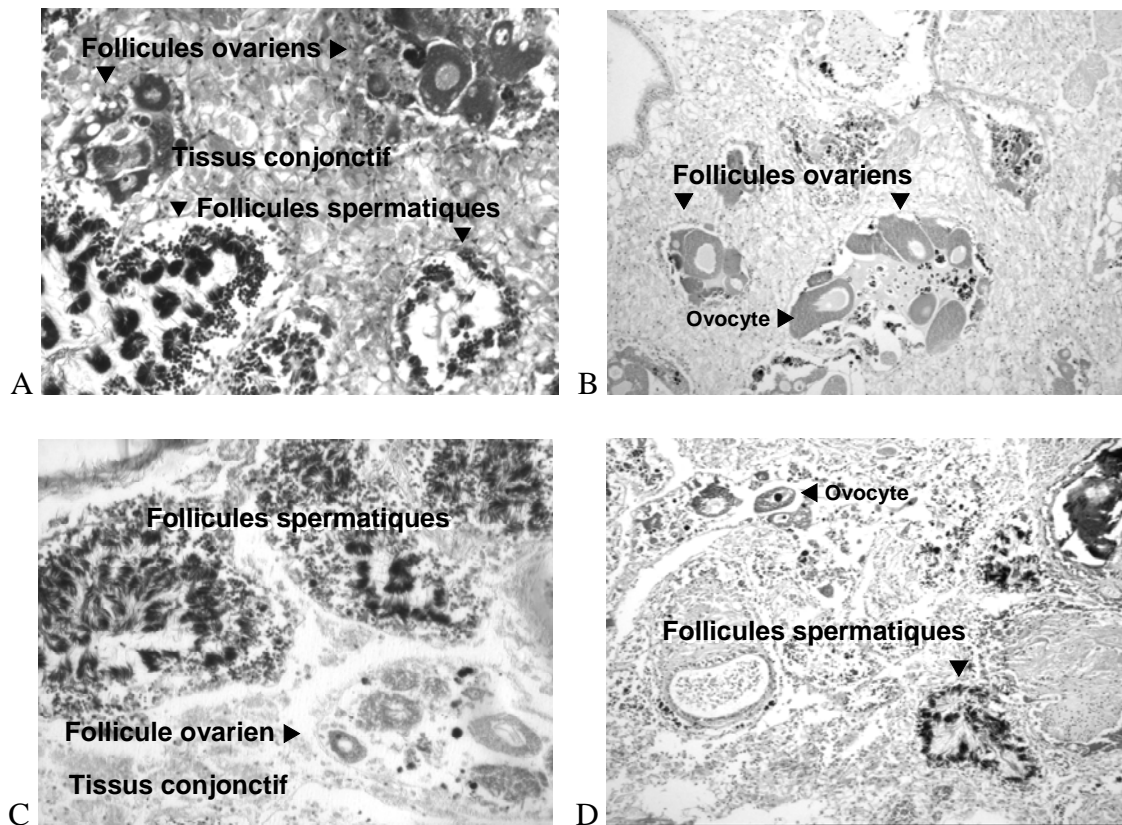


Figure 37 : Coupe dans la masse viscérale de *C. fluminea* après 30 jours d'exposition
 Témoin ($\times 400$), **B.** 2000 ng/L de E2 ($\times 100$)
C. 50 ng/L de TBT ($\times 400$) **D.** 500ng/L de TBT ($\times 100$)

Chez les témoins (Figure 37A), on peut observer une coexistence des 2 types de gonades, avec les follicules ovariens et spermatiques remplis. Chez les individus exposés à 2000 ng/L de 17β -œstradiol (Figure 37B), les ovocytes sont semblables à ceux observés chez les témoins, et même plus volumineux. Cependant, pour la partie mâle, il y a très peu de spermatozoïdes autour des spermatogonies. L'exposition des animaux au TBT pendant 30 jours permet d'observer dès 50 ng/L (Figure 37C) une réduction du nombre d'ovocytes dans les follicules ovariens alors que le nombre

de spermatozoïdes autour des ovogonies semble plus important. Pour les animaux exposés à 500 ng/L de TBT (Figure 37D), il y a une réduction importante de la taille et du nombre d'ovocytes.

Des études récentes ont montré que des expositions de bigorneaux (*Littorina littorea*) à de très faibles doses de composés organostanniques entraînaient la masculinisation et la stérilisation, et donc l'échec de la reproduction chez les femelles (Schulte-Oehlmann, *et al.*, 1997; Oehlmann, *et al.*, 1998). Cependant, lors d'études sur l'escargot hermaphrodite *Lymnaea stagnalis* exposé au TBT, aucun changement pathologique de la gonade n'a pu être observé, bien que les taux de fécondité/ponte aient été diminués (Czech, *et al.*, 2001).

Chez *C. fluminea*, bien qu'il semble que la partie femelle paraisse prédominante chez les animaux exposés au 17 β -œstradiol et la partie mâle, prédominante chez les animaux exposés au TBT, il n'est pas possible de conclure sur l'influence de ces composés sur les gonades à cause de la quantité insuffisante d'échantillon.

IV.A.2.2.b Conclusion de l'exposition au TBT et 17 β -œstradiol

En raison de sa nature hermaphrodite, il semble difficile d'évaluer, sur le terrain, les perturbations endocriniennes de la reproduction de *C. fluminea*; les deux sexes étant naturellement successifs avec une période d'hermaphrodisme simultanée. L'induction de la synthèse de protéines, apparentées aux vitellines par les xéno-œstrogènes, offre la perspective de développer un biomarqueur d'effets représentatif d'une perturbation endocrinienne. Une connaissance approfondie de la vitellogenèse s'avère toutefois indispensable pour établir les limites d'utilisation *in situ* des vitellines comme biomarqueur d'effets.

Outre leur influence possible sur le système immunitaire, 17 β -œstradiol et TBT paraissent également agir sur l'état d'avancement de maturation des gonades, mâle ou femelle, ou favoriser le développement de l'une par rapport à l'autre. S'il atteint une population entière, ce déséquilibre pourrait à terme empêcher les fécondations et la survie d'une population.

Il est donc nécessaire d'effectuer chez *C. fluminea* une étude plus approfondie sur l'influence des modulateurs endocriniens sur les gonades, puis effectuer une caractérisation des variations saisonnières des concentrations hormonales et en vitellines et rechercher la localisation tissulaire de leur synthèse en fonction du sexe prédominant.

IV.A.2.3 Conclusion

Ces premières étapes nous ont permis de mettre au point des méthodes de dosages pour plusieurs paramètres. Les différents types d'exposition ont permis d'évaluer les réponses des différents paramètres choisis en fonction de la dose d'un contaminant et d'évaluer leur potentiel en tant que biomarqueur d'effets.

Certains paramètres nécessitent un développement complémentaire et un suivi saisonnier, tels que le *DNA unwinding* et la perturbation de la reproduction. Ceux-ci ne seront pas retenus pour l'application en conditions semi-contrôlées (mésocosmes).

De ces expositions, nous retiendrons donc les paramètres ayant une mise en œuvre facile et ayant une réponse nette en fonction de la dose de contaminant et du temps d'exposition: l'**activité de la phagocytose**, les **changements structuraux des lysosomes**, ainsi que l'oxydation des bases de l'ADN (**8-oxodG**). Ces marqueurs seront utilisés lors d'expositions dans les mésocosmes afin de les évaluer en milieu naturel et d'en déterminer le temps de réponse vis-à-vis de la mortalité des individus et de les valider comme biomarqueurs d'effets chez *C. fluminea*. L'utilisation des conditions semi-contrôlées nous permettra d'ajouter les indices de conditions à ces marqueurs.

IV.B Application et validation en conditions semi-contrôlées

Le choix de travailler dans des conditions semi-contrôlées permet de reconstituer, au mieux, un écosystème continental naturel. Pour cela, l'emploi d'un mésocosme dynamique ouvert (les Rivières Pilotes) est choisi afin de recréer une représentativité écologique optimale.

Les Rivières Pilotes (Figure 30) sont achevées en juillet 1999 sur le site de l'usine de Lacq (64) après des études menées par le Dr. A. Bassères. L'exploitation de ces rivières artificielles se rattache à deux domaines importants du droit environnemental : la mesure d'impact *in situ* et l'évaluation des risques. La mesure d'impact est un thème d'actualité nécessaire à la surveillance et la protection des écosystèmes. La Directive Cadre Eau et la future loi sur l'eau française imposent une surveillance accrue des rejets et donc l'étude d'impact des produits. Le projet des Rivières Pilotes permet de participer à l'élaboration des outils nécessaires à cette tâche.

Il s'agit de quantifier et qualifier l'impact d'une pollution grâce à l'étude des populations et des communautés présentes dans l'écosystème. Le projet de validation de bioindicateurs en eau douce, avec l'utilisation des biomarqueurs chez *C. fluminea*, a vu le jour grâce au partenariat avec l'Agence de l'Eau Adour-Garonne, le LPTC et le CEMAGREF de Bordeaux et de Lyon. Ce projet doit permettre de comparer les outils biocénétiques déjà existants aux réponses physiologiques et biochimiques du bivalve. La précocité et la souplesse d'utilisation des biomarqueurs seraient des valeurs ajoutées dans la mesure d'impact *in situ*. Ils doivent donc être validés notamment au cours de programmes comme celui-ci.

Des expérimentations préliminaires ont été nécessaires au lancement du programme de validation des biomarqueurs. Elles ont été menées pour s'assurer de la bonne colonisation des mésocosmes et déterminer le type de sédiment à employer. Le programme s'articule ensuite en deux phases :

- Une première phase de validation de 8 mois a eu pour objectif l'étude des cinétiques de colonisation des canaux et la vérification de la reproductibilité des réponses biologiques et des mesures physico-chimiques dans les canaux expérimentaux. Cette phase a permis d'une part de définir que le temps minimum nécessaire pour une colonisation biologique homogène sur l'ensemble des canaux était de 2 mois et d'autre part, de démontrer statistiquement la reproductibilité des canaux expérimentaux entre eux et l'absence de différence spatiale entre les prélèvements sur toute la longueur du canal (Bassères & Tramier, 2001).

Cette phase est suivie par un plan de mélange organisé selon un réseau de Scheffé qui permet des comparaisons multiples :

- La seconde phase comprend plusieurs types d'expositions, pendant lesquelles l'écosystème de chaque canal est exposé à un composé pur ou en mélanges de deux ou trois composés. Au cours de la première étape de cette seconde phase, des individus de *C. fluminea* ont été exposés à des produits purs pour l'évaluation de la sensibilité et de la précocité de réponse des biomarqueurs d'exposition en comparaison à celles de l'écosystème. Lors de la seconde étape les animaux ont été exposés à des mélanges afin de tester les interactions des substances (détermination du type d'interaction : antagonisme, additivité ou synergie), de vérifier s'il existait une réponse spécifique à chaque substance et si cette signature apparaissait au sein des mélanges.

Nous avons effectué deux types d'exposition dans les Rivières Pilotes. La première exposition consiste à valider les réponses des biomarqueurs d'effets en milieu naturel, en exposant des individus à un gradient de contamination. La seconde exposition entre dans le cadre de la seconde étape de la phase II de validation des biomarqueurs. Elle nous permettra de contrôler la prédiction des biomarqueurs d'effets de la mortalité des individus de *C. fluminea* et de comparer leurs réponses à celles des biomarqueurs d'exposition, à travers l'échelle indiciaire multimarqueurs, et de l'abondance d'une communauté (oligochètes).

IV.B.1 Exposition au méthacrylate de méthyle

La production annuelle de méthacrylate de méthyle (MAM) a été évaluée à 470 000 tonnes par an (Institute for Health and Consumer Protection, 2002). Il est utilisé en priorité en tant qu'intermédiaire pour la fabrication de polymères. Les produits principaux sont des plaques d'acrylique, des esters de méthacrylate, des moulages, des extrusions, des émulsions, des polymères de dispersion et des résines réactives. Les préparations de résines réactives sont appliquées en industries et la construction tels que les revêtements de sols (~ 20%), les produits adhésifs (~60%) et dentaires (~80%). Le MAM peut être un composé résiduel provenant des peintures, des laques et des vernis (~0,5%), il se retrouve dans l'environnement à partir des eaux de rejet, des fumées et des émulsions de polymères aqueuses (peintures, vernis). Dans l'atmosphère, le MAM réagit avec les radicaux hydroxyles et l'ozone. Les radicaux libres formés dans l'eau par l'action de la lumière pourraient donc réagir avec le MAM mais il n'y a pas eu d'estimation des taux de ces réactions (Institute for Health and Consumer Protection, 2002).

Le méthacrylate de méthyle est produit commercialement soit par la voie des acétones cyanhydriques (methacrylamide sulfates) soit par l'oxydation de l'isobutène ou du *tert*-butanol (voie des C₄). Une troisième voie de production, mineure, utilise l'éthylène (voie des C₂). L'acide méthacrylique entre dans la formation du MAM en tant qu'intermédiaire (ECETOC, 1995). Très peu d'études sur la toxicité du MAM ont été menées. En effet, celui-ci ne semble avoir des effets qu'à fortes doses et principalement en inhalation, provoquant principalement des irritations des voies aériennes chez les humains (Lomax, *et al.*, 1997). Les essais menés chez les animaux ont permis de déterminer les doses induisant 50% de mortalité (DL50) chez les rats (8 à 10 mg/kg) et les souris et lapins (5 mg/kg) soit en inhalation chez le rat à 29,8 mg/l et chez la souris >25 mg/l après une exposition de 4 heures. Les signes cliniques de la toxicité du MAM s'expriment par une augmentation du rythme ventilatoire en 2 à 5 minutes, suivit par des faiblesses de motricité et une diminution de la respiration en 15 à 40 minutes (Hext, *et al.*, 2001).

IV.B.1.1 Objectifs

Ce travail s'insère dans le cadre d'une étude plus vaste menée dans les Rivières Pilotes, portant sur l'évaluation des risques. L'objectif de cette étude a été de tester les biomarqueurs d'effets sur un gradient de concentration d'un produit n'entrant pas dans les catégories classiquement utilisées en écotoxicologie. Cette exposition nous permettra de valider les réponses des biomarqueurs d'effets en milieu naturel. Les biomarqueurs d'effets devront pouvoir donner des réponses en fonction du gradient, indépendamment des paramètres environnementaux.

IV.B.1.2 Conditions physico-chimiques

IV.B.1.2.a *Paramètres environnementaux*

La température (Figure 38) de tous les canaux varie de la même manière ; tous les animaux subissent les mêmes variations. La température minimale des canaux est de 15 °C, mais 2 pics de température à 19°C ont eu lieu avant le premier et le deuxième temps de prélèvement (7 et 15 jours d'exposition). Après le deuxième pic, la température de l'eau augmente régulièrement pendant 11 jours pour atteindre 21°C, 5 jours avant la fin de l'exposition.

Il faut noter que cette période (fin juillet 2003) correspond au début de la canicule qui a sévi début août 2003 en France (pour la même période l'année précédente, la température de l'eau variait entre 14 et 18°C).

Au début des expositions, la quantité d'oxygène dissous (Figure 39) dans les canaux était comprise entre 8 et 10 mg/L. Cependant, ces quantités chutent de manière trop importante pour certains canaux pour que cela soit due à une véritable diminution de la concentration en oxygène dissous. Les sondes plongeant de façon permanente dans l'eau, celles-ci peuvent être recouvertes d'algues dont la croissance est favorisée par l'ensoleillement, entraînant une stagnation de l'eau au niveau de la sonde.

Le pH (Figure 40) des différents canaux reste autour de 7 et de 8 pendant toute la durée de l'exposition.

La conductivité augmente régulièrement entre le début (~90 $\mu\text{S}/\text{cm}$) et la fin de l'exposition (~ 160 $\mu\text{S}/\text{cm}$) pour rechuter aux valeurs initiales. Comme pour les sondes mesurant la quantité d'oxygène dissous, ces sondes peuvent être influencées par les algues se trouvant autour des sondes. La chute finale correspond à un nettoyage des sondes. On considère donc, que la valeur de la conductivité n'a pas changé entre le début et la fin de l'exposition.

Les paramètres chimiques sont mesurés dans les témoins : NH_4^+ (< 0,2 mg/L), NO_3^- (2,4 à 3,5 mg/L), PO_4^{3-} (< 0,2 mg/L), chlorures (1,8 à 2,9 mg/L), DCO (< 14 mg/L), DBO_5 (0 à 2,5 mg/L), Pt (0 mg/L).

Les valeurs mesurées des paramètres physico-chimiques sont conformes au bon maintien des organismes.

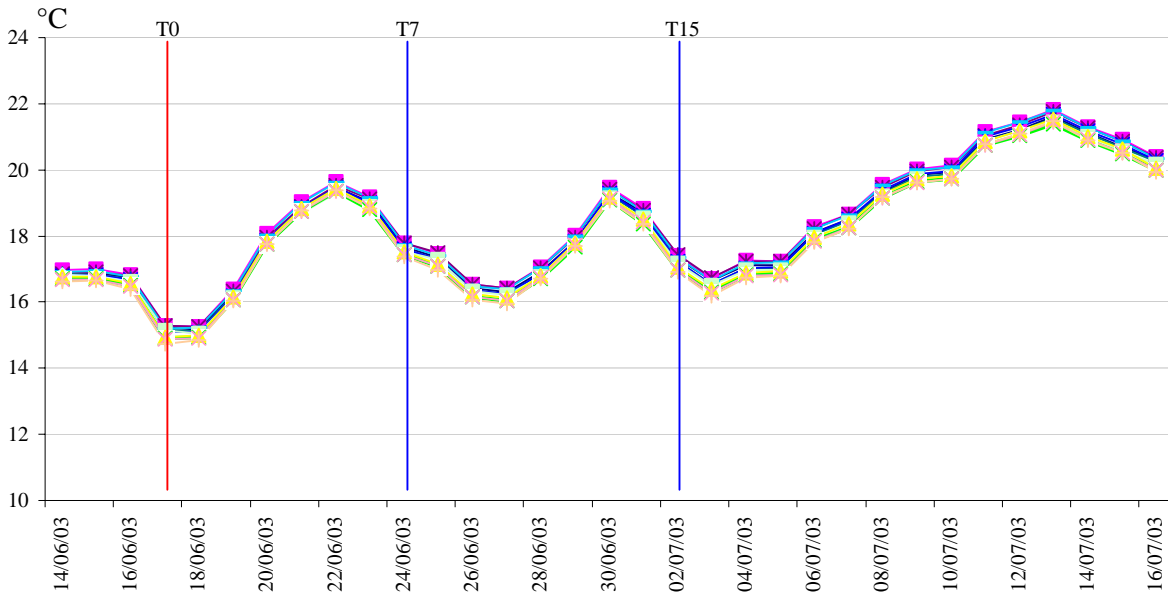


Figure 38 : Evolution de la température de l'eau au cours du temps

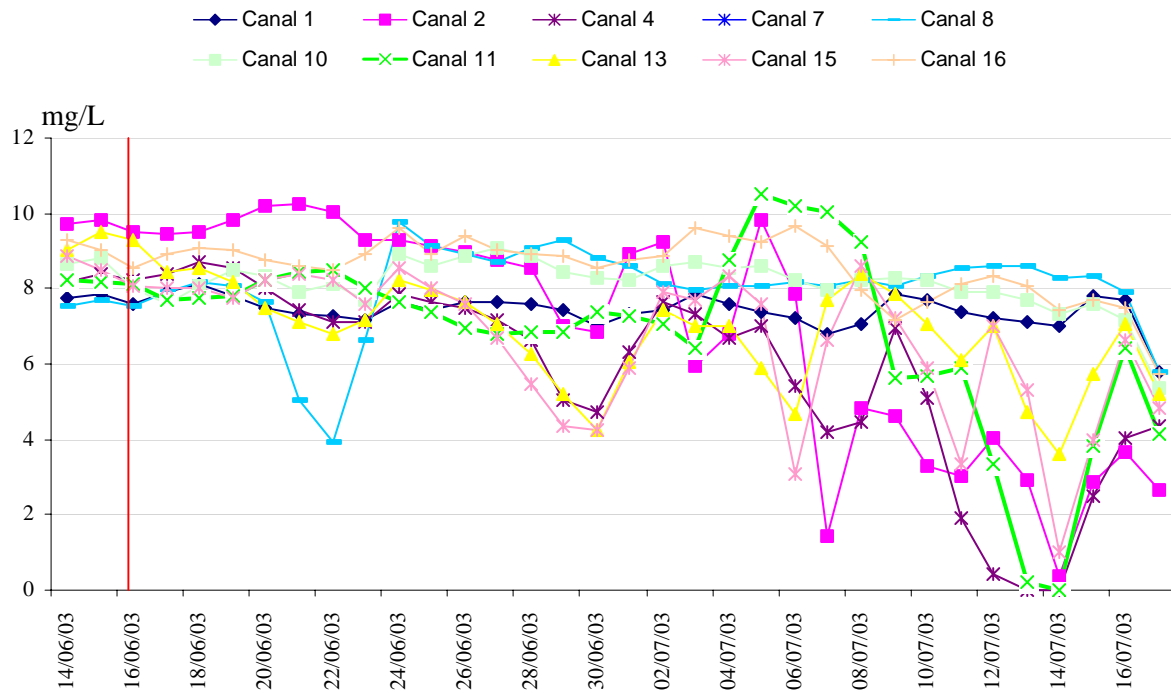


Figure 39 : Evolution de l'oxygène dissous dans l'eau au cours du temps

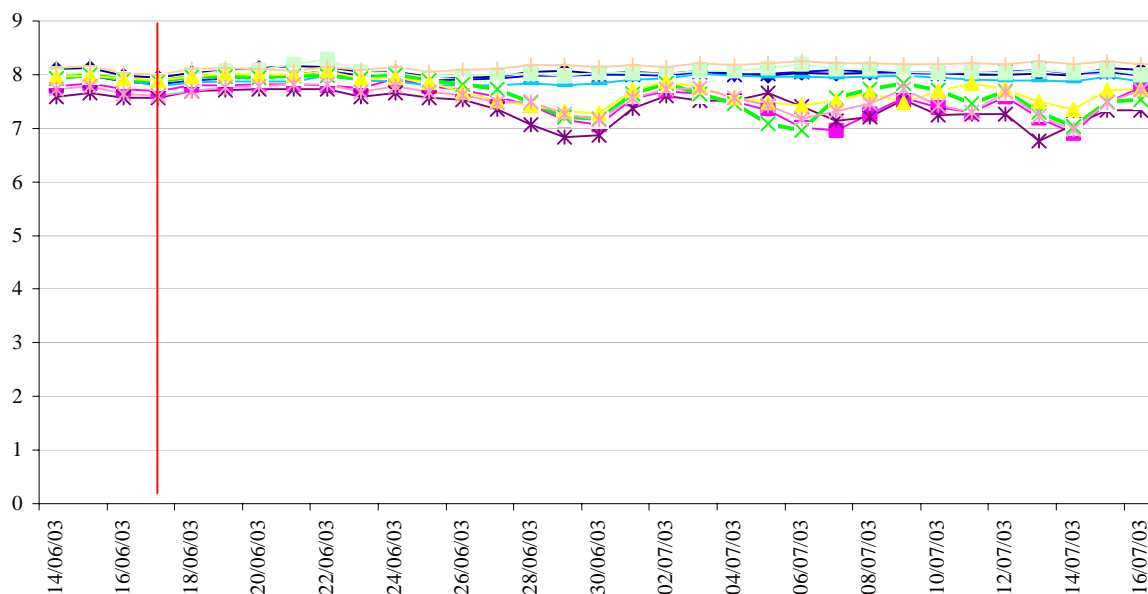


Figure 40 : Evolution du pH de l'eau au cours du temps

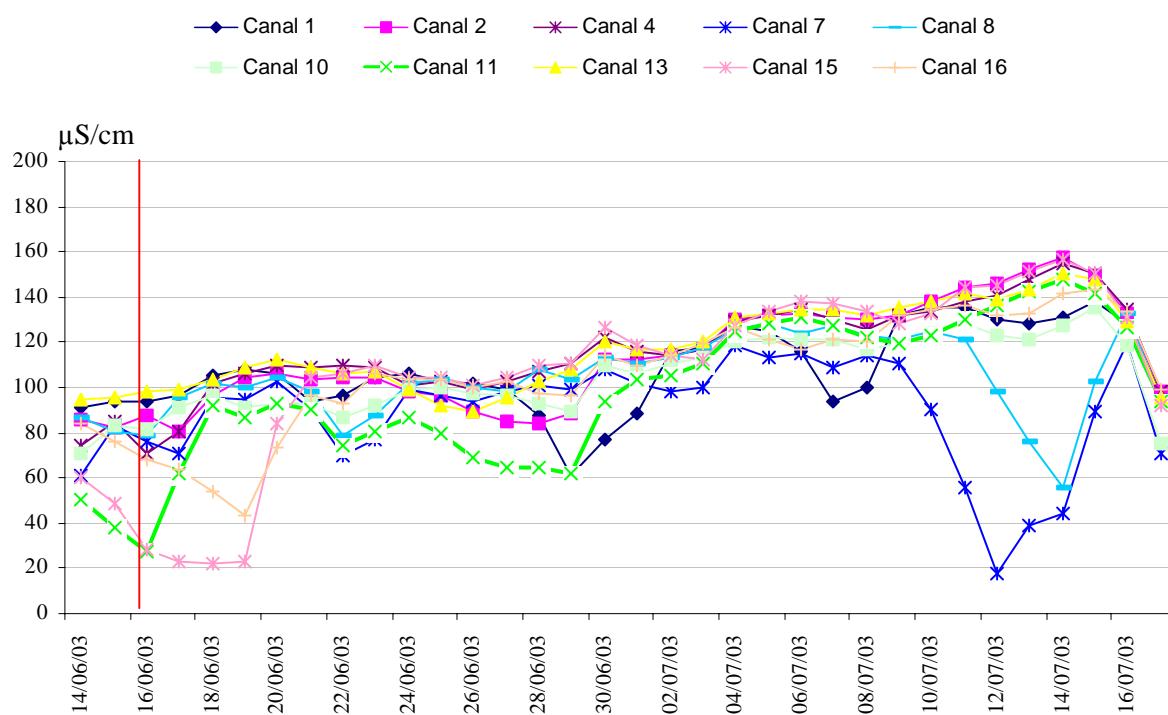


Figure 41 : Evolution de la conductivité de l'eau au cours du temps

IV.B.1.2.b Concentration du MAM dans les canaux

Les mesures de la concentration nominale et mesurée du méthacrylate de méthyle dans les canaux sont reportées dans le Figure 42. Les concentrations moyennes calculées sont indiquées dans le Tableau 11.

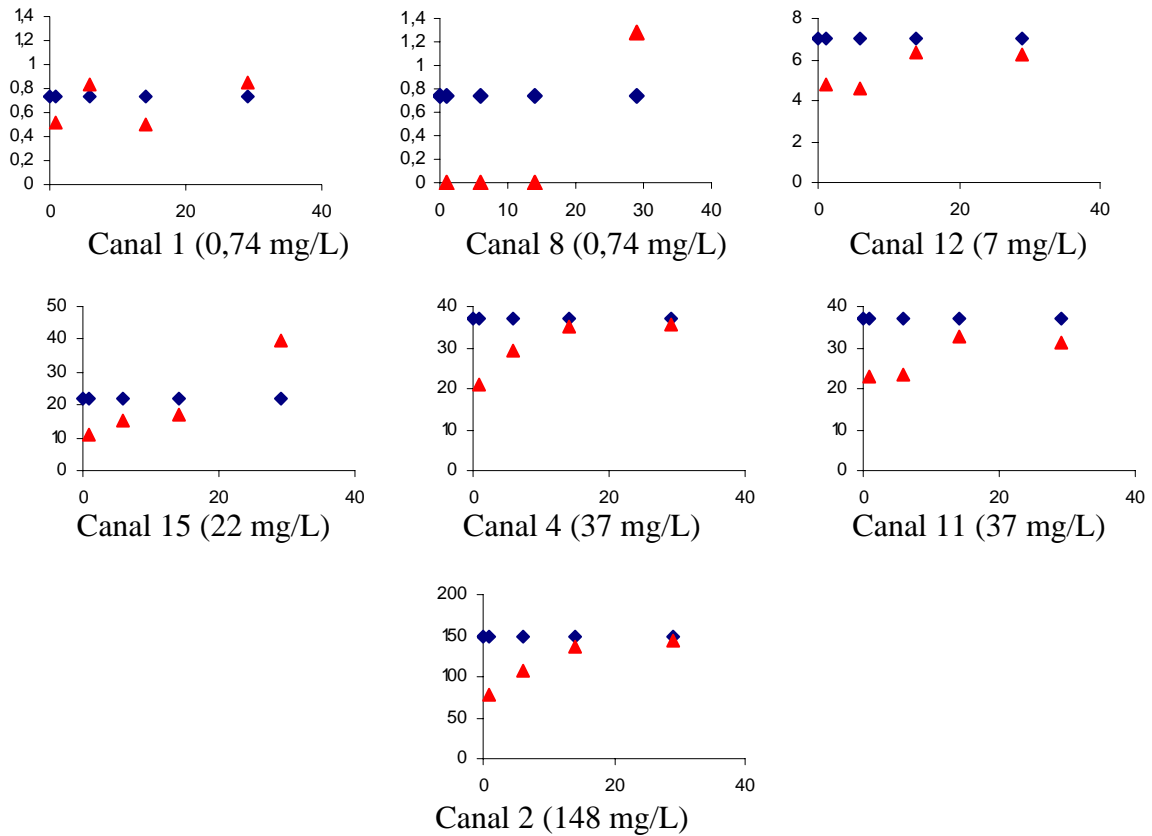


Figure 42 : Concentrations (mg/L) de MAM dans les canaux en fonction du temps (jours) (◆ : concentration nominale, ▲ : concentration mesurée).

	Concentration nominale (mg/L)	Moyenne sur l'exposition (mg/L)
Canal 1	0,74	0,74 ± 0,16
Canal 8	0,74	0,7 ± 0,6
Canal 12	7	6,0 ± 0,7
Canal 15	22	14 ± 12
Canal 4	37	32 ± 3
Canal 11	37	30 ± 3
Canal 2	148	133 ± 16

Tableau 11 : Concentrations nominales et moyennes (avec écart-type) du méthacrylate de méthyle dans l'eau

Nous garderons les valeurs des concentrations nominales pour la présentation des résultats.

IV.B.1.3 Mesures des biomarqueursIV.B.1.3.a *Mortalité*

Après une semaine passée en stabulation dans les enclos avant l'exposition, aucune mortalité n'a été relevée. Au cours de l'expérimentation, la mortalité des individus reste faible (<5%) pour beaucoup de conditions expérimentales. On peut cependant noter (Figure 43) qu'il y a une augmentation de ce taux de mortalité chez les animaux exposés à 148 mg/L de MAM en fonction du temps et ce, dès 7 jours, jusqu'à 30 jours d'exposition avec 100 % de mortalité. De plus, après 30 jours d'exposition, on peut remarquer qu'à partir de 22 mg/L de MAM dans le milieu, le taux de mortalité augmente en fonction de la dose.

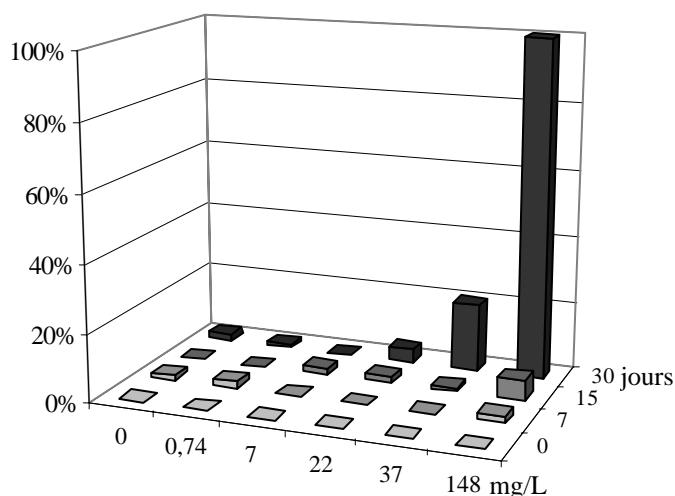


Figure 43 : Taux de mortalité de *C. fluminea* mesuré au début de l'exposition, avant l'injection des produits (0) puis après 7, 15 et 30 jours.

IV.B.1.3.b *Indices de condition*

Comme pour la mortalité, les indices de condition (IC) (Figure 44) ont été relevés à T0 avant l'injection du MAM. On peut noter que l'IC a augmenté de près de 10 % entre le début de l'exposition et le 7^{ème} jour d'exposition.

Dès 7 jours d'exposition, les animaux exposés à 148 mg/L de MAM ont un indice de condition significativement inférieur à celui des témoins.

Après 15 jours d'exposition, la tendance de l'indice de condition est à la diminution en fonction de la dose. Outre l'IC des individus exposés à 148 mg/L de MAM, celui des individus exposés à 37 mg/L est également significativement inférieur à celui des individus témoins. De plus les IC des animaux exposés à 22, 37 et 148 mg/L de MAM sont significativement inférieurs à celui des animaux exposés à 0,74 mg/L de MAM.

Après 30 jours d'exposition, il n'y a pas de différences significatives entre les animaux exposés et les témoins. Cependant, les animaux exposés à 22 mg/L et 37 mg/L ont des IC significativement inférieurs à ceux exposés à 0,74 mg/L de MAM.

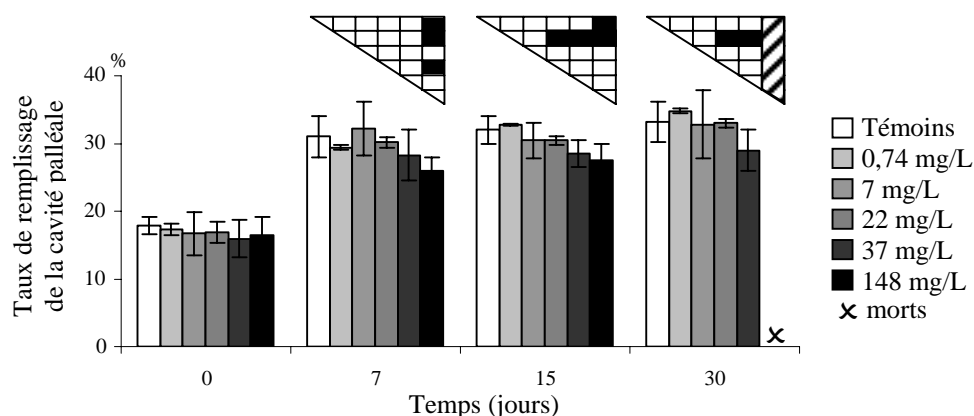


Figure 44 : Indices de condition mesurés au début de l'exposition avant l'injection des produits (T0), puis après 7, 15 et 30 jours d'exposition.

Les différences significatives ($P < 0,05$) entre les paires de moyennes, pour un temps de prélèvement donné, sont indiquées dans la matrice triangulaire par des carrés noirs.

IV.B.1.3.c Viabilité cellulaire

Le rouge neutre est un colorant vital ; seules les cellules vivantes peuvent l'absorber. On utilise cette propriété pour évaluer la quantité de cellules restant en vie (Figure 45). Dès 7 jours d'exposition, le taux d'absorption du rouge neutre par les hémocytes d'animaux exposés à 148 mg/L est significativement inférieur (~ 85 %) aux taux d'absorption observés chez les animaux exposés aux autres concentrations. Cette diminution s'accroît après 15 jours d'exposition. La viabilité des hémocytes des animaux exposés à 7 et 37 mg/L de MAM est significativement inférieure par rapport aux témoins, avec un taux d'absorption respectivement de ~95 % et de ~85 %.

Après 30 jours d'exposition, la viabilité des hémocytes des animaux exposés à 37 mg/L de MAM est réduite d'environ 30 %, alors que celle des animaux exposés aux autres concentrations ne change pas.

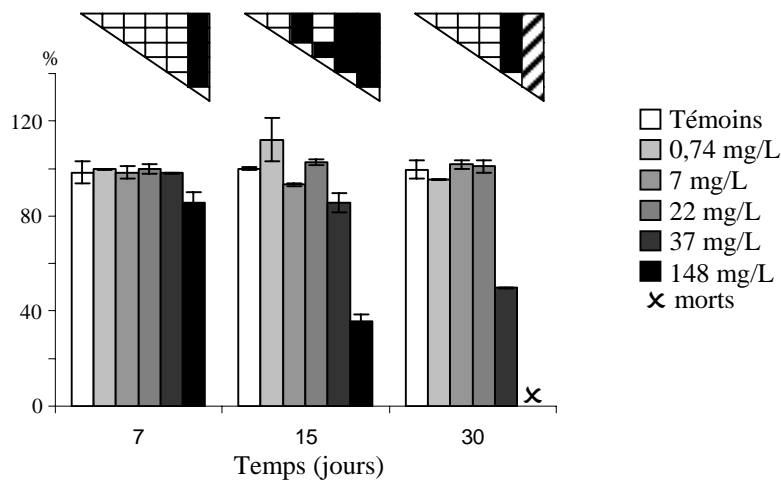


Figure 45 : Viabilité cellulaire (en pourcentage par rapport aux témoins)

Les différences significatives ($P < 0,05$) entre les paires de moyennes, pour un temps de prélèvement donné, sont indiquées dans la matrice triangulaire par des carrés noirs.

IV.B.1.3.d Activité de phagocytose des hémocytes

Dès 7 jours d'exposition, on peut observer une inhibition de la phagocytose significativement différente des témoins (Figure 46), chez les animaux exposés à 148 mg/L de MAM. L'inhibition est encore plus importante après 15 jours d'exposition. Les animaux exposés à 37 mg/L de MAM ont une activité de phagocytose significativement différente entre 15 et 30 jours d'exposition. Les autres concentrations de MAM ne semblent pas induire d'inhibition de la phagocytose.

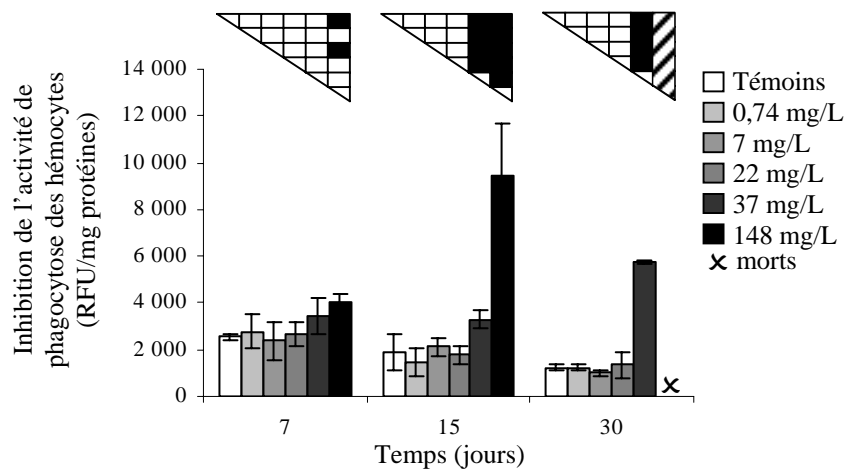


Figure 46 : Inhibition de la phagocytose

Les différences significatives ($P < 0,05$) entre les paires de moyennes, pour un temps de prélèvement donné, sont indiquées dans la matrice triangulaire par des carrés noirs.

IV.B.1.3.e Réponse des lysosomes – changements structuraux des lysosomes

Très peu d'effets ont pu être observés sur les réponses des lysosomes de la glande digestive (Figure 47). Après 7 jours d'exposition, seule la densité surfacique lysosomiale (Sv) des animaux exposés à 37 mg/L de MAM est différente de celles des animaux exposés à 7 et 22 mg/L de MAM. De même, seules les valeurs des densités numériques lysosomiales (Nv) des animaux exposés à 22 et 37 mg/L de MAM sont significativement différentes l'une de l'autre.

Ce n'est qu'après 15 jours d'exposition que l'on observe une augmentation significative des valeurs de la densité volumique (Vv) et surfacique (Sv) chez les animaux exposés à 0,74, 7 et 22 mg/L de MAM. Cette variation traduit une augmentation de la taille des lysosomes dans la cellule. La diminution de la densité numérique lysosomiale (Nv) observée chez les animaux exposés à 37 mg/L de MAM traduit une diminution du nombre de lysosomes dans la cellule.

Après 30 jours d'exposition, les valeurs des paramètres stéréologiques ont tendance à être plus faibles que chez les témoins. De plus, chez les témoins, les valeurs de Vv et Sv ont tendance à avoir augmenté au cours de l'exposition avec une diminution de S/V. Ces variations indiquent une augmentation de la taille des lysosomes ; ils occupent alors plus d'espace dans la cellule digestive.

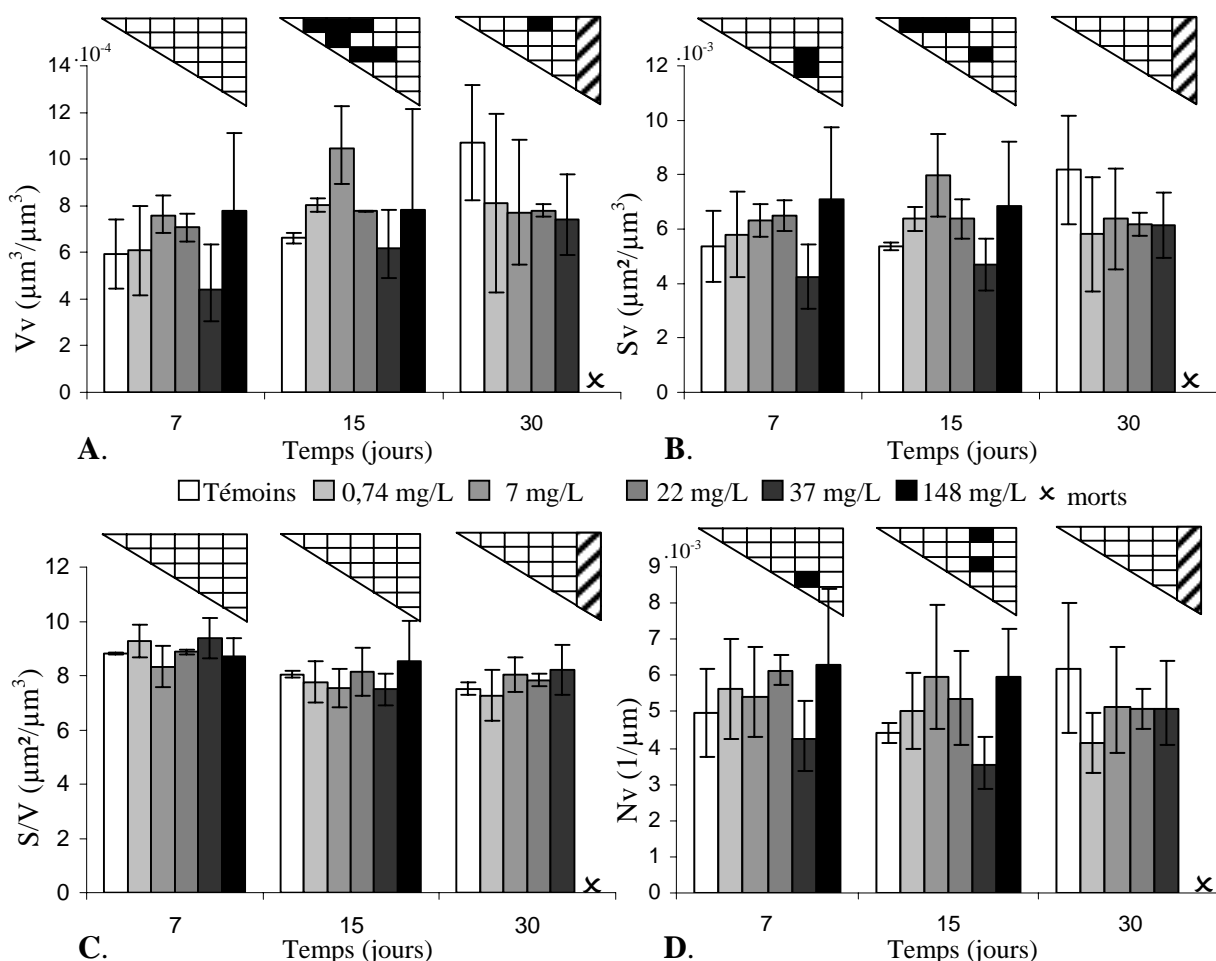


Figure 47 : Moyennes et écart-types des paramètres stéréologiques mesurés sur les lysosomes de la glande digestive de *C. fluminea* exposées au MAM pour 7, 15 et 30 jours.

A. densité volumique (Vv), B. densité surfacique (Sv), C. rapport surface/volume des lysosomes (S/V), D. densité numérique (Nv). Les différences significatives ($P < 0,05$) entre les paires de moyennes, pour un temps de prélèvement donné, sont indiquées dans la matrice triangulaire par des carrés noirs.

IV.B.1.3.f 8-oxodG

Les taux de 8-oxodG mesurés avant le début de l'exposition ont un niveau de base se situant autour de 5 bases oxydées pour 10^6 dG.

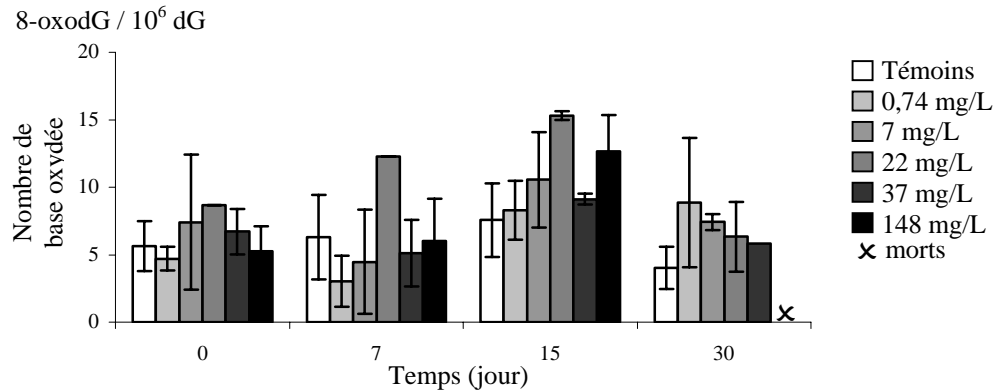


Figure 48 : Taux de 8-oxodG (nombre de bases oxydées pour 10^6 bases normales) mesurés dans les branchies de *C. fluminea* exposées au MAM pendant 7, 15 et 30 jours.

Rappelons que, les taux de 8-oxodG ici ne sont indiqués qu'à titre indicatif pour illustrer une tendance (des raisons commerciales, ne nous ont pas permis d'effectuer l'ensemble des mesures pour obtenir suffisamment de données pour effectuer des statistiques).

Il ne semble pas y avoir d'augmentation des taux en fonction de la concentration, mais plutôt une variation en fonction du temps. Après 7 et 30 jours d'exposition, les taux 8-oxodG sont équivalents, alors qu'ils sont plus élevés après 15 jours d'exposition.

IV.B.1.4 Discussion

Le méthacrylate de méthyle ne semble avoir des effets (altérations fonctionnelles) sur *C. fluminea* qu'à des doses élevées. Il se pourrait cependant que cette absence soit due aux concentrations trop faibles du produit ; les concentrations mesurées sont inférieures aux concentrations nominales (pour les concentrations de 0,74 à 22 mg/L).

Dans cette expérimentation seuls l'indice de condition, la viabilité cellulaire et l'activité de la phagocytose des hémocytes répondent dès le 7^{ème} jour d'exposition à 148 mg/L de MAM. Au 15^{ème} jour d'exposition, si ces marqueurs répondent également à 37 mg/L de MAM, les autres marqueurs (changements structuraux des lysosomes et 8-oxodG) présentent des variations significatives pour toutes les concentrations. Au dernier jour d'exposition, l'indice de condition, la viabilité cellulaire et l'activité de la phagocytose ne répondent qu'à 37 mg/L de MAM. Il semble donc qu'il y ait un seuil de concentration pour ce composé, en deçà duquel les biomarqueurs d'effets ne répondent pas.

La diminution de la viabilité cellulaire et de l'activité de la phagocytose des hémocytes sous l'action du MAM pourraient s'expliquer par le blocage d'un transporteur d'électrons et le découplage de la phosphorylation oxydative empêchant la synthèse de l'ATP comme il a été montré sur des mitochondries de foie de rat (Bereznowski, 1994). L'effet observé *in vitro* peut dans des conditions *in vivo* entraîner la mort cellulaire.

Chez les mammifères, une concentration de 0,5% du monomère a réduit la capacité de phagocytose des macrophages *in vitro* (Welch, 1978). Les processus de phagocytose faisant appel des transmetteurs, les taux, initiaux et maximum, d'entrée de Ca²⁺ peuvent être directement inhibés par le MAM. Une série d'expérimentations *in vitro* a montré que dans le sang (homme, rat) la disparition du MAM était due à une hydrolyse catalysée par les enzymes du sérum (Bereznowski, 1995). De plus, les cinétiques de conversion indiquent que cette voie est la principale étape majoritaire, et peut-être même la seule, du métabolisme du MAM dans le sang (Corkill, *et al.*, 1976; Bereznowski, 1995).

La métabolisation du MAM peut donc expliquer que certains biomarqueurs sont moins sensibles. L'hydrolyse du méthacrylate de méthyle en acide méthacrylique et en méthanol serait une explication du peu de variations observées dans les paramètres stéréologiques des changements structuraux des lysosomes. En effet, le traitement de rats avec de l'acide méthacrylique durant 6 mois (1% dans l'eau de boisson) n'a pas permis de révéler ni une augmentation de mortalité parmi les animaux ni des changements histologiques dans les tissus ou dans les enzymes du sérum. Ceci est probablement dû à l'absorption rapide de l'acide méthacrylique à de faibles doses par le foie et sa dégradation rapide en métabolites non-toxiques (Bereznowski, 1995). Le méthanol quant à lui ne semble pas avoir d'influence sur les paramètres stéréologiques (article 3).

- **Comparaison aux biomarqueurs d'exposition**

Lors de cette expérimentation, deux espèces de bivalves ont été exposées : *Corbicula fluminea* pour la mesure des biomarqueurs d'effets et *Unio tumidus* pour la mesure des biomarqueurs d'exposition (GRd, GSH, GSSG, Se GPx, MDA) (Coffinet, *et al.*, 2005).

Nous avons appliqué l'échelle indiciaire multimarqueurs aux biomarqueurs d'exposition chez *U. tumidus* (Tableau 12A). L'ordre des couleurs obtenu fait apparaître nettement le gradient de contamination. La réponse des biomarqueurs d'effets (Tableau 12B) chez *C. fluminea* évolue aussi selon le gradient de contamination.

De plus, les réponses observées avec les biomarqueurs d'exposition (T7) précèdent celles des biomarqueurs d'effets, alors qu'au temps suivant (T15) on peut observer une superposition des deux types de biomarqueurs.

	T7	T15
0	7	20
0,74	19	18
7	29	21
34	36	70
148	68	

A

	T7	T15	T30
		♣ ♠	
		♠	♠
		♣ ♠ ♠	♣ ♠
	♣ ♠ ♠ ⊗	♣ ♠ ⊗	☠

B

Biomarqueurs d'exposition
Code des couleurs :
 Bleu : environnement peu pollué
 Vert : environnement modérément pollué
 Jaune : environnement significativement pollué
 Orange : environnement lourdement pollué
 Rouge : environnement hautement pollué

Biomarqueurs d'effets
 ♣ : viabilité cellulaire
 ♠ : phagocytose
 ♠ : lysosomes
 ⊗ : indice de condition
 ☠ : 100% de mortalité

Tableau 12 : **A.** Echelle indiciaire multimarqueurs et **B.** réponses significatives des biomarqueurs d'effets, en fonction des concentrations de MAM (mg/L) et du temps d'exposition

IV.B.1.5 Conclusion

L'exposition d'animaux en conditions semi-contrôlées à un gradient de contamination, nous a permis d'observer que les marqueurs ont répondu en fonction de ce gradient, bien que le méthacrylate de méthyle ne semble avoir eu des effets que sur les animaux exposés aux plus fortes doses. Lorsque la majorité des marqueurs répondent de façon significative, pour un temps donné, nous avons observé la mortalité des animaux (*C. fluminea*) au temps de prélèvement suivant.

De plus, les réponses ont été identiques pour les concentrations en réplicat.

Comparés aux biomarqueurs d'exposition, mesurés chez *Unio tumidus*, qui réagissent de façon précoce à la présence du contaminant (Coffinet, *et al.*, 2005), les biomarqueurs d'effets chez *C. fluminea* traduisent une réponse plus prédictive des effets toxiques (mortalité) du xénobiotique sur l'organisme. Cette comparaison nous montre qu'il peut y avoir conjointement une réponse de défense (biomarqueur d'exposition) face à un contaminant et des altérations fonctionnelles (biomarqueur d'effets) ; l'animal lutte pour éliminer le composé toxique, mais commence à subir des altérations fonctionnelles.

Les réponses des différents marqueurs au gradient de contamination et leur reproductibilité en mésocosme, nous permet de conclure sur leur utilisation possible comme biomarqueurs d'effets en conditions naturelles.

L'étape suivante va consister en une exposition à des substances pures et à des mélanges pour finaliser la validation de ces biomarqueurs.

IV.B.2 Evaluation de la réponse des biomarqueurs d'effets avec des substances pures ou des mélanges

La grande majorité des études toxicologiques, portant sur les contaminants, concernent l'évaluation des expositions à des produits seuls. En pratique, les êtres vivants sont exposés à des mélanges variables et complexes de produits pouvant agir indépendamment comme dans le cas d'une exposition à un produit seul, mais ils peuvent également interagir pour moduler les effets du mélange dans son ensemble.

La majorité des études de toxicité des mélanges en toxicologie aquatique se rapportent aux mélanges de métaux lourds (Bolognesi, *et al.*, 1999). Un travail systématique a été réalisé sur les effets combinés des produits chimiques organiques industriels.

IV.B.2.1 Les mélanges

Différentes stratégies ont été décrites pour évaluer les propriétés toxicologiques des mélanges complexes. L'approche intégrative permet l'étude d'un mélange dans son ensemble, fractionnant un mélange afin de déterminer les constituants causals et synthétiques, et permet d'étudier les interactions entre les agents dans des combinaisons simples (Mauderly, 1993). Ces dernières permettent d'obtenir des informations sur les interactions (Eide, 1996).

IV.B.2.1.a *Mélanges simples et complexes*

Un *mélange simple* est défini comme étant constitué d'un petit nombre de produits (10 ou moins) et dont la composition est qualitativement et quantitativement connue. On peut trouver des exemples dans les cocktails de pesticides ou une combinaison de médicaments (Feron & Groten, 2002).

Un *mélange complexe* est défini comme étant constitué de dix, cent ou mille produits chimiques et dont la composition est quantitativement et qualitativement tout à fait inconnue. On en trouve des exemples dans les eaux de boisson, les poussières de bois, l'atmosphère des lieux de travail.

Il y a une différence marquée dans la manière dont la toxicité des mélanges est traitée. Dans l'approche « bottom-up », le mode d'action ou le site d'action du produit chimique dans le mélange est connu, déterminant le modèle qui pourra prédire la toxicité du mélange. Pour l'approche « top-down », le type d'interaction entre les produits chimiques n'est pas connu. C'est plutôt la toxicité totale du mélange qui est mesurée.

IV.B.2.1.b *Terminologie*

Les termes utilisés pour décrire la toxicité des mélanges sont nombreux. Cette quantité rend confus et gêne le développement de leur étude. Il existe « différents termes décrivant des phénomènes qui semblent être les mêmes mais sont souvent employés de manière complètement différente selon les auteurs » (Calabrese, 1991). Quelques exemples sont présentés dans le Tableau 13.

Synergie	Addition	Antagonisme
Plus qu'additif	Action attendue	Moins qu'additif
Supra additif	Simple addition	Infra-additif
Potentialisation	Action additive	Addition compétitive
Sommation positive	Sommation	Antagonisme compétitif
Action commune	Action commune	Action commune
Interaction	Interaction	Interaction

Tableau 13 : Exemple de termes utilisés pour la description de différents types actions communes (modifié d'après Marking (1985)).

On considère donc qu'il y a 3 classes d'actions communes (interactions) : l'additivité, la synergie et l'antagonisme (Calamari & Alabaster, 1980; Marking, 1985; Calabrese, 1991) :

Addition : la toxicité du mélange est égale à celle de la somme des toxicités connues des produits chimiques du mélange ($1+1=2$). Il faut cependant noter qu'il existe deux types d'additivité (concentration et réponse).

Synergie : la toxicité du mélange est supérieure à l'addition des toxicités des produits du mélange ($1+1>2$).

Antagonisme : la toxicité du mélange est inférieure à l'addition des toxicités des produits du mélange ($1+1<2$).

IV.B.2.2 Objectifs

Cette étude en mésocosme s'intègre dans la validation de biomarqueurs pour leur utilisation *in situ*. La validation des biomarqueurs d'effets en milieu semi-contrôlé (mésocosme) comprend la possibilité d'une quantification de la réponse des biomarqueurs, l'observation des effets, la présence ou non d'un seuil dans les doses pour obtenir ces effets, la précocité des réponses et la sensibilité en fonction du temps d'exposition et de la dose.

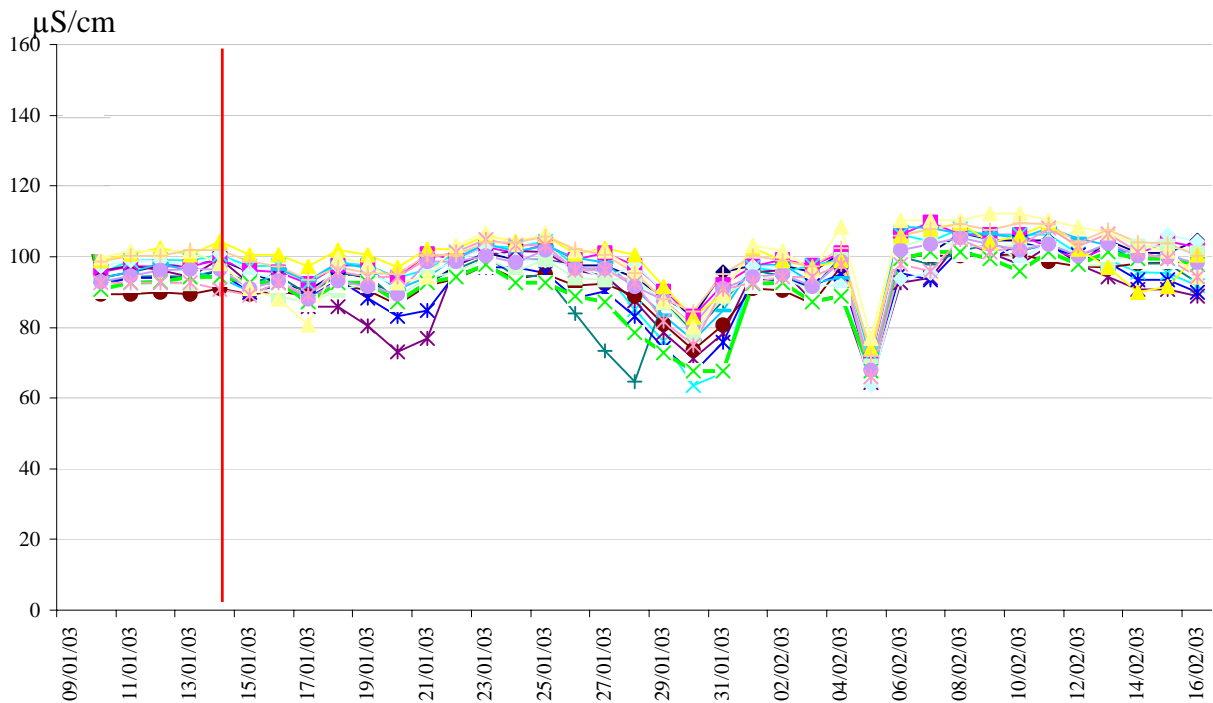
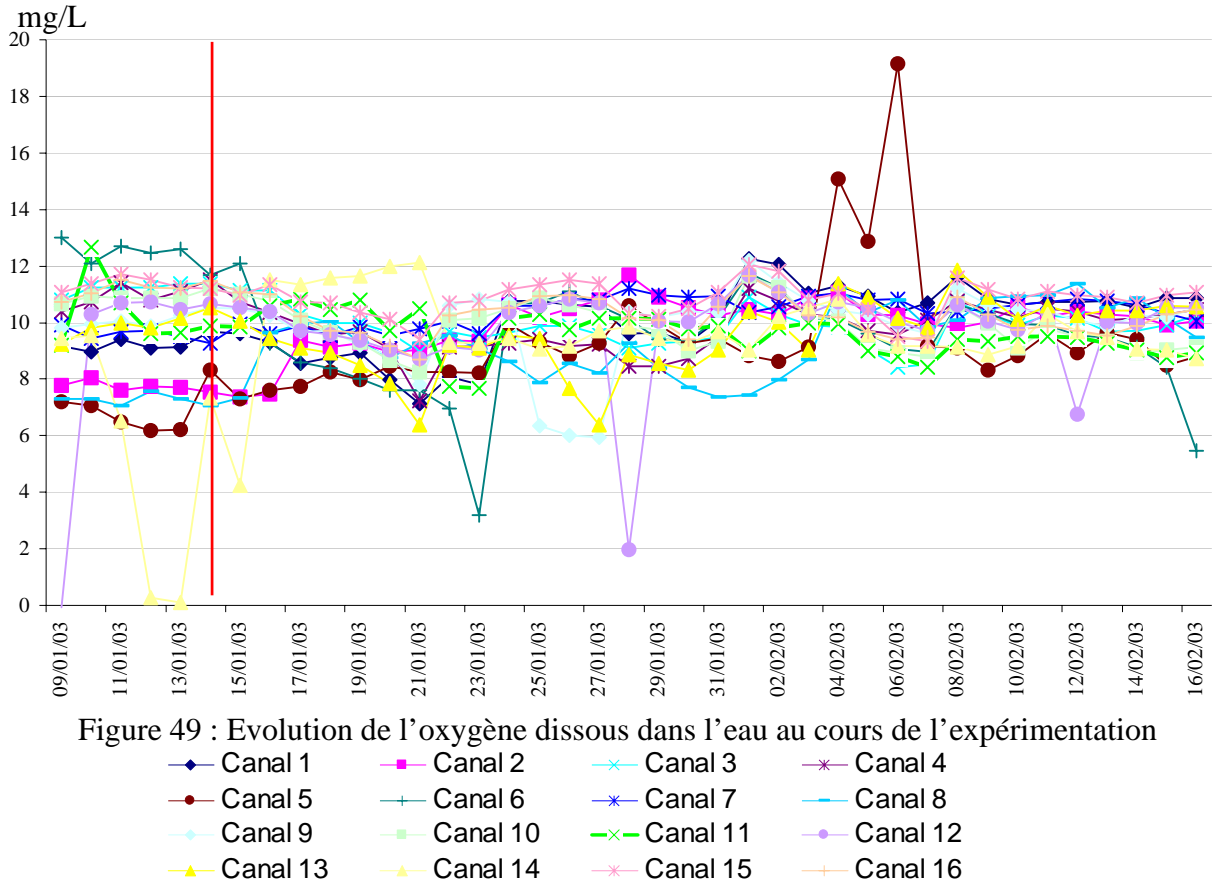
L'objectif de cette étude était de quantifier les effets induits par des produits seuls ou en mélanges et de valider les biomarqueurs d'effets sélectionnés auparavant. Cette exposition permettra de déterminer les temps de réponses des biomarqueurs et d'observer s'il existe une précocité de leur réponse par rapport à la mortalité des individus.

IV.B.2.3 Conditions physico-chimiques

Les résultats des mesures des paramètres physiques sont mesurés pour chaque canal : l'oxygène dissous (Figure 49), la conductivité (Figure 50), le pH (Figure 51), la température (Figure 52) et le débit (Figure 53). Ces mesures sont effectuées avant le début des expositions (T0 indiqué par un trait rouge). Globalement, la quantité d'oxygène dissous se situe entre 6 et 12 mg/L, la conductivité varie entre 60 et 110 $\mu\text{S}/\text{cm}$, le pH entre 7,5 et 8,5, la température entre 5 et 9°C et le débit moyen dans les canaux est de 12 m^3/h soit 10cm/s.

Les paramètres chimiques sont mesurés chez les témoins : NH_4^+ (0 à 0,15 mg/L), NO_3^- (3,4 à 6,2 mg/L), PO_4^{3-} (0 à 0,2 mg/L), chlorures (2,2 à 5,4 mg/L), DCO (< 10 mg/L), DBO_5 (0 à 5 mg/L), Pt (0 mg/L).

Les valeurs mesurées des paramètres physico-chimiques sont conformes au bon maintien des organismes.



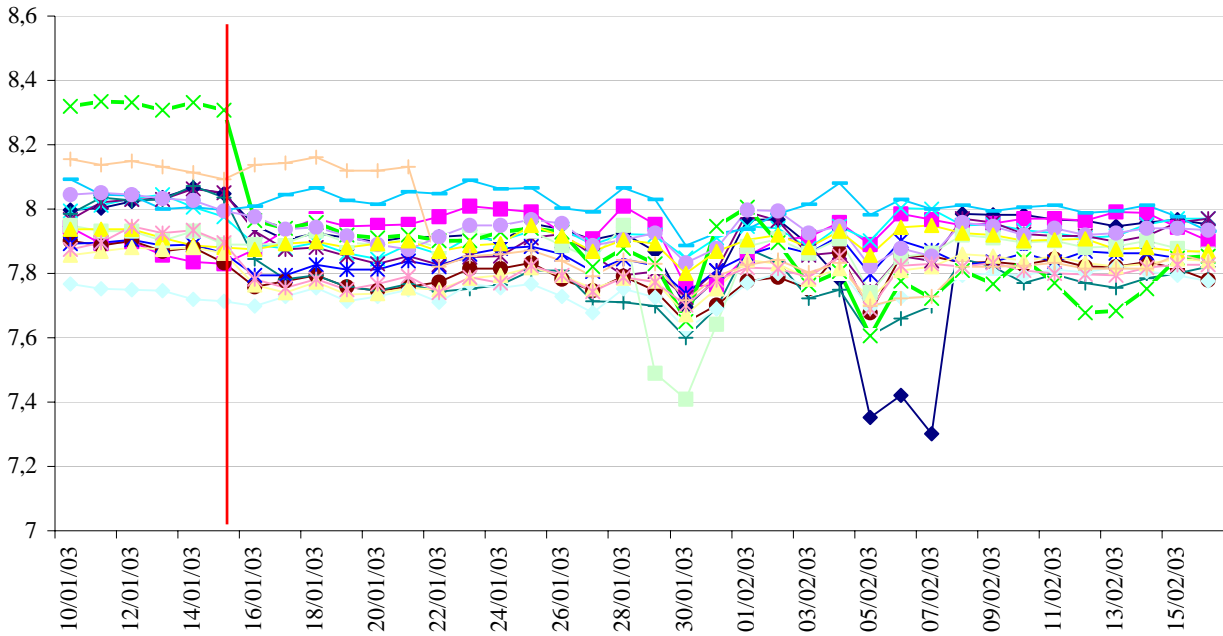


Figure 51 : Evolution du pH de l'eau au cours de l'expérimentation



Figure 52 : Evolution de la température de l'eau au cours de l'expérimentation

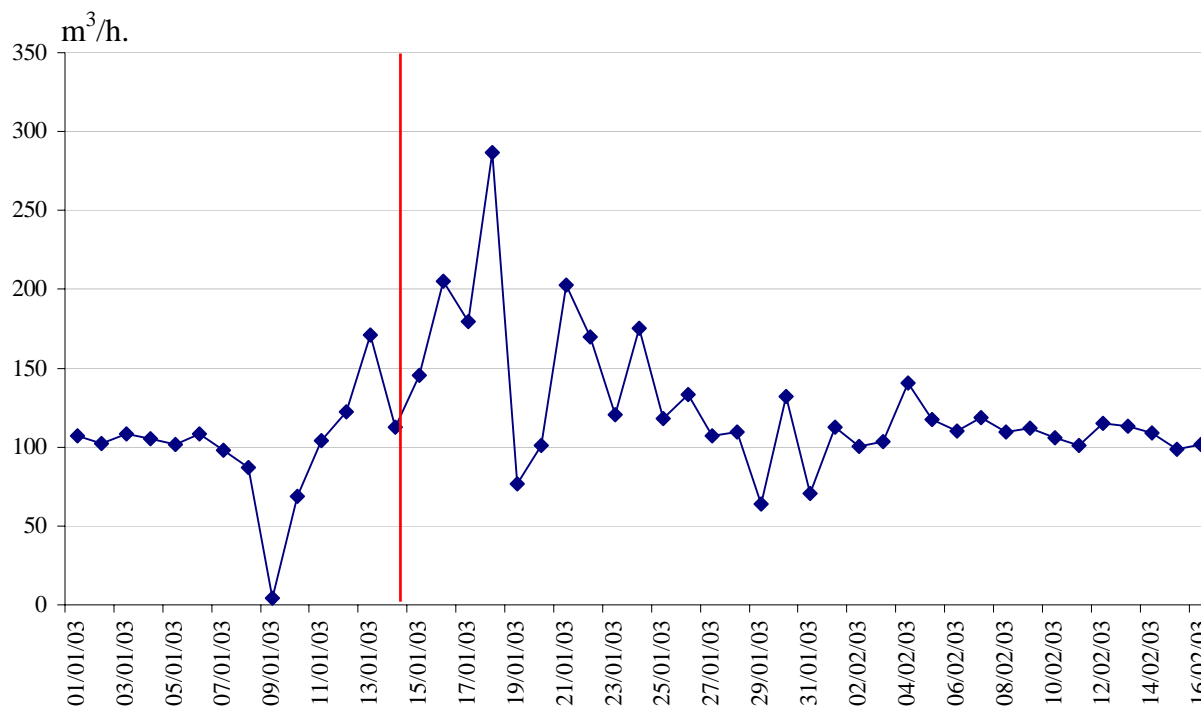


Figure 53 : Débit (mesuré au courantomètre en sortie de pépinière)

Les mésocosmes ouverts permettent l'entrée de toutes les espèces à l'intérieur du système, y compris les algues, où elles peuvent se développer. Les sondes (pH, O₂, température) sont disposées en fin de canal, parallèlement au courant, et sont donc un obstacle dans le canal. Les algues peuvent venir s'y accumuler et provoquer des perturbations lors des mesures. Cela peut expliquer les variations subites des paramètres physiques observées pour certains canaux (canal 5 pour l'oxygène dissous, canal 1 pour le pH, ensemble des canaux pour la conductivité au 22^{ème} jour d'exposition). L'augmentation du débit les 4 premiers jours d'exposition traduit une forte pluviosité à cette période. Ces variations de débits vont également modifier les concentrations des produits qui sont délivrés par des pompes en fonction du débit théorique désiré.

Les différentes valeurs des paramètres physico-chimiques varient dans le même sens pour tous les canaux, on peut alors considérer que les produits, qu'ils soient seuls ou en mélange, n'affectent pas les paramètres physico-chimiques.

IV.B.2.4 Concentrations des produits dans les canaux

Les concentrations des différents contaminants, mesurées par le groupe Indicateurs Biologiques du Pôle de Recherche Mont/Lacq (Total Petrochemicals), sont reportées dans les Figures 54, 55 et 56.

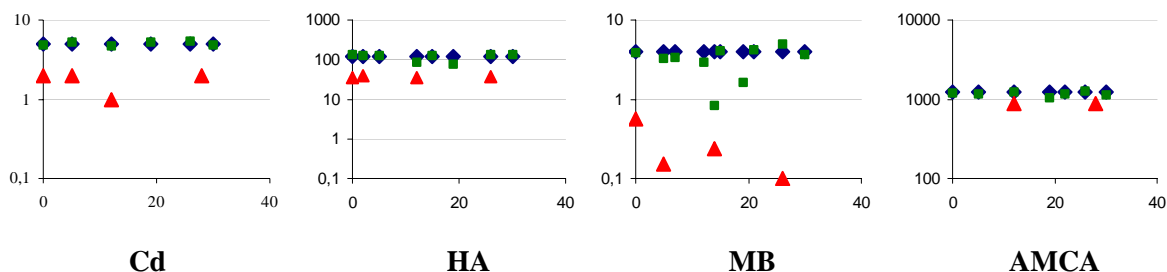


Figure 54 : Valeurs des concentrations (en $\mu\text{g/L}$) des produits seuls (canaux 9, 8, 5, 12) (\blacklozenge : concentration nominale, \blacksquare : concentration ajoutée, \blacktriangle : concentration mesurée).

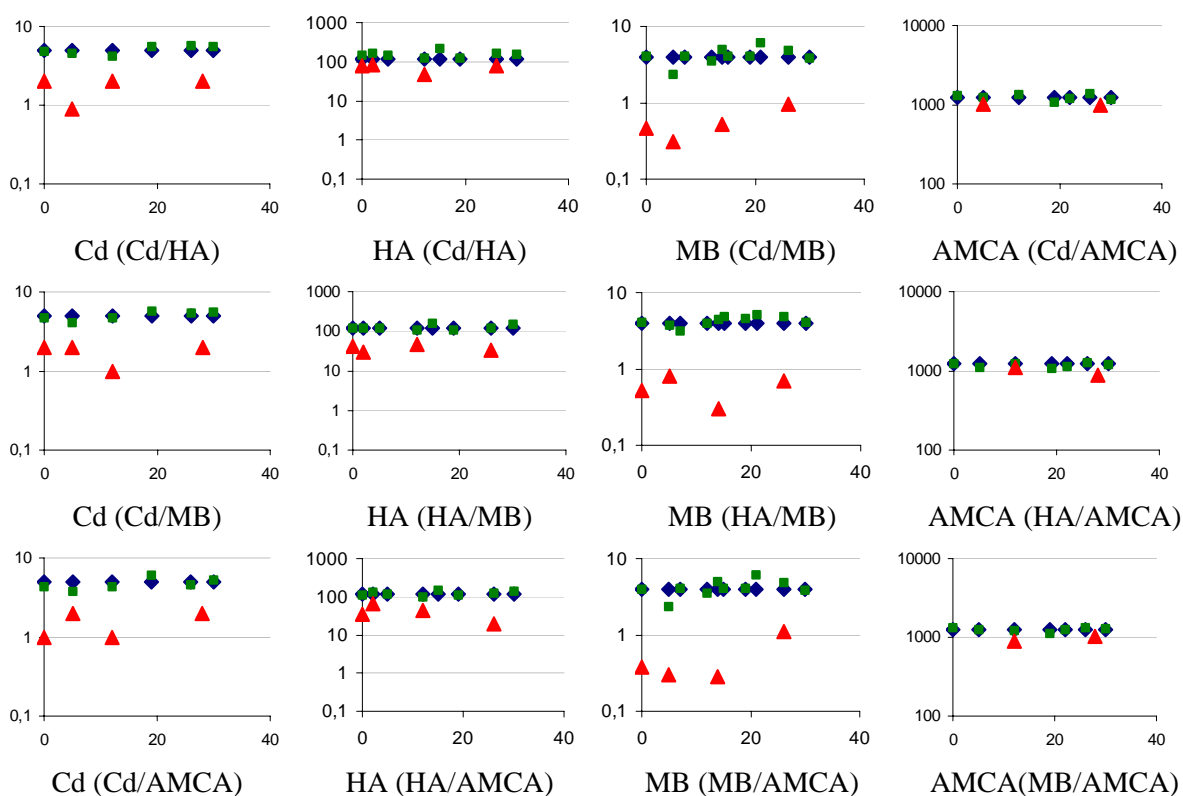


Figure 55: Valeurs des concentrations (en $\mu\text{g/L}$) pour chaque produit, dans les mélanges binaires (canaux 2, 4, 6, 7, 11, 14)

(\blacklozenge : concentration nominale, \blacksquare : concentration ajoutée, \blacktriangle : concentration mesurée).
(Cd : cadmium, HA : huile anthracénique, MB : méthyl parathion, AMCA : acide monochloracétique)

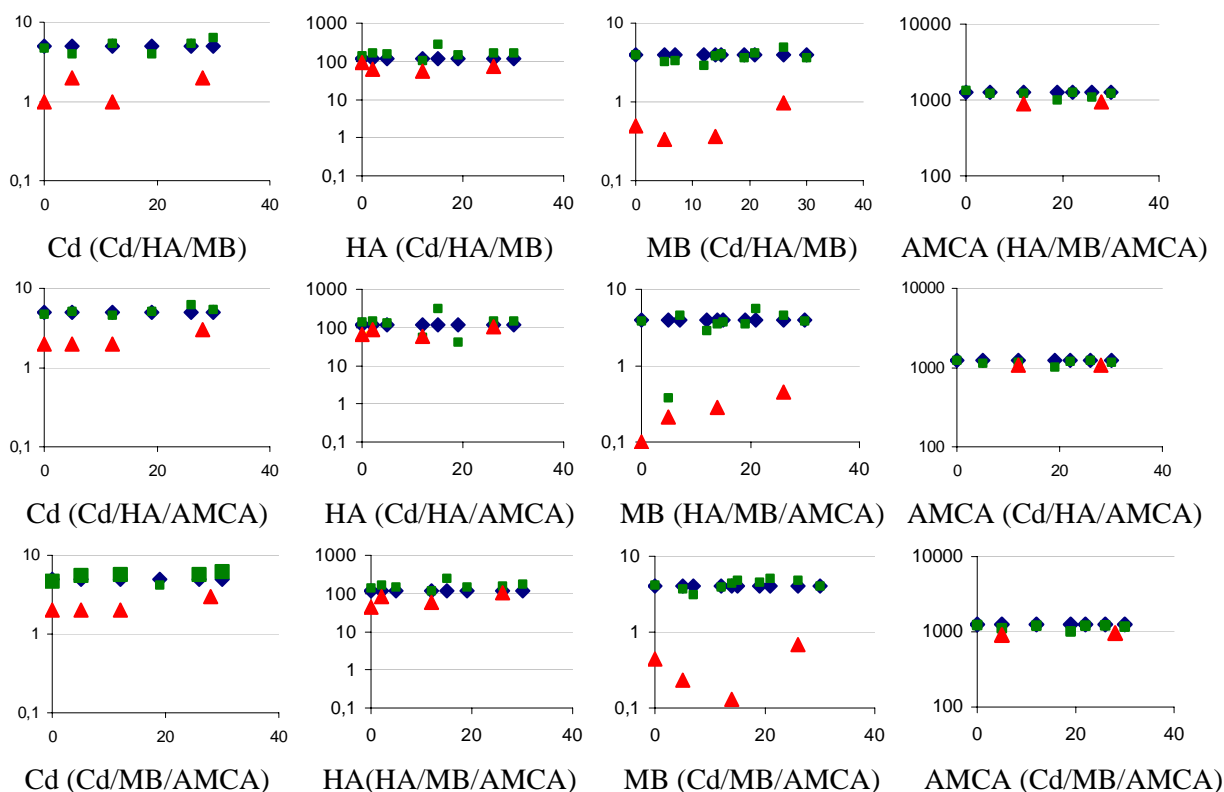


Figure 56 : Valeurs des concentrations (en $\mu\text{g/L}$) de chaque produit, dans les mélanges ternaires (canaux 1, 3, 13, 15)

(\blacklozenge : concentration nominale, \blacksquare : concentration ajoutée, \blacktriangle : concentration mesurée).

(Cd : cadmium, HA : huile anthracénique, MB : méthyl parathion, AMCA : acide monochloracétique)

Pour le cadmium (Cd) et le méthylparathion (MB), les concentrations sont faibles, il existe donc des incertitudes quant aux valeurs obtenues par rapports aux limites de quantification.

Les concentrations de l'huile anthracénique (HA) et acide monochloracétique (AMCA) semblent être assez stables dans toutes les configurations (pur ou en mélange). Les concentrations en méthylparathion varient au cours du temps. Les mesures de concentrations effectuées dans les solutions mères ne semblent pas concorder aux concentrations attendues.

IV.B.2.5 Mesures des biomarqueurs

IV.B.2.5.a Mortalité

La mortalité commence à apparaître après 15 jours d'exposition (Figure 57) chez les animaux exposés au cadmium (12%), au méthylparathion, à l'AMCA, aux mélanges binaires Cd/HA, Cd/MB, et ternaire Cd/HA/MB (3%) ainsi que chez un des témoins (8%).

Après 30 jours d'exposition, on observe une mortalité très élevée chez les animaux exposés au mélange ternaire Cd/HA/MB (28%), puis dans les mélanges Cd/MB, HA/MB/AMCA (14%), MB, MB/AMCA, Cd/MB/AMCA, HA/MB/AMCA (8%) et plus faible chez les animaux exposés au Cd, HA, AMCA, Cd/AMCA, HA/AMCA et les témoins (4%).

Pour les mélanges binaires, la formule de Abbott donne un facteur d'interaction (FI) égal à 1 pour les animaux exposés au mélange Cd/MB indiquant un phénomène d'additivité. Pour les autres mélanges binaires, le FI est inférieur à 1 (antagonisme). Parmi les mélanges ternaires, Cd/HA/MB semble avoir eu un effet supérieur à l'additivité ; l'addition des effets dus aux produits seuls est dépassée.

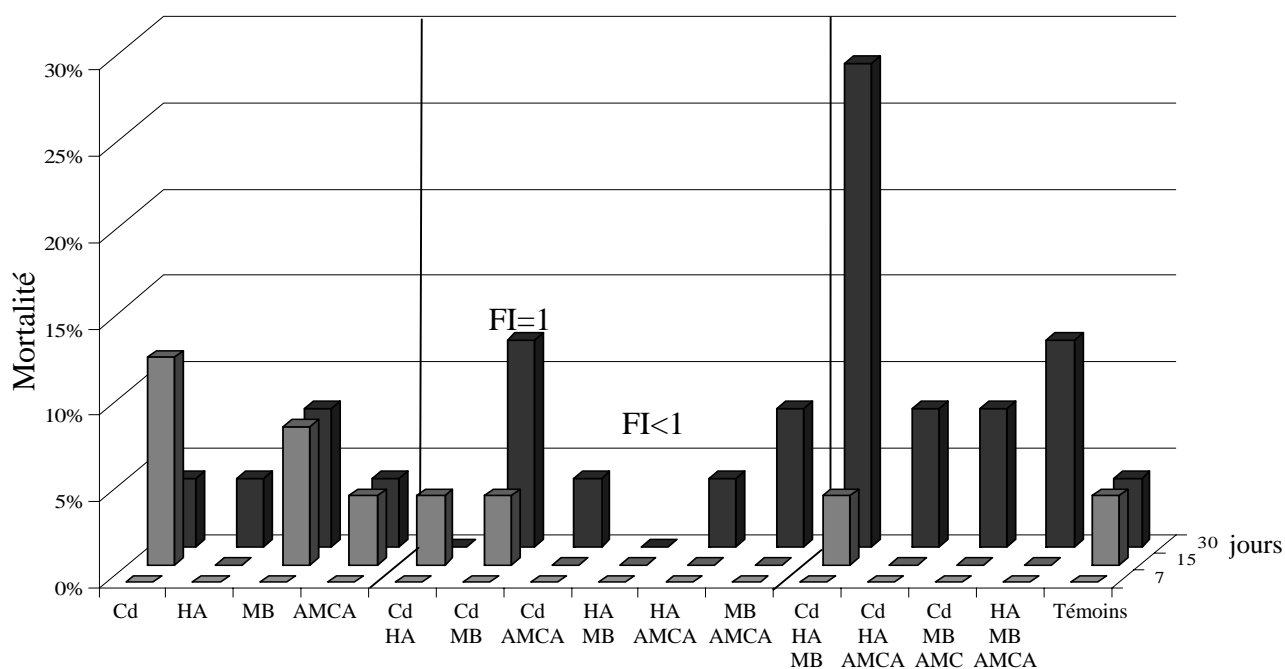


Figure 57 : Taux de mortalité des palourdes d'eau douce par condition (facteurs d'interaction FI donnés pour les mélanges binaires)

(Cd : cadmium, HA : huile anthracénique, MB : méthyl parathion, AMCA : acide monochloracétique)

IV.B.2.5.b Indices de condition

Les indices de condition (Figure 58) des lots contaminés ne sont pas significativement différents des lots témoins. Mais ceux des animaux dans les rivières artificielles sont plus élevés que ceux des animaux dans le site de prélèvement. Cette différence est due au fait que le lac de Cazaux-Sanguinet est un lac oligotrophe, donc avec peu de nutriment disponible pour les animaux. La tendance est donc à une augmentation du taux de remplissage de la cavité palléale, une fois les animaux transplantés dans les rivières artificielles.

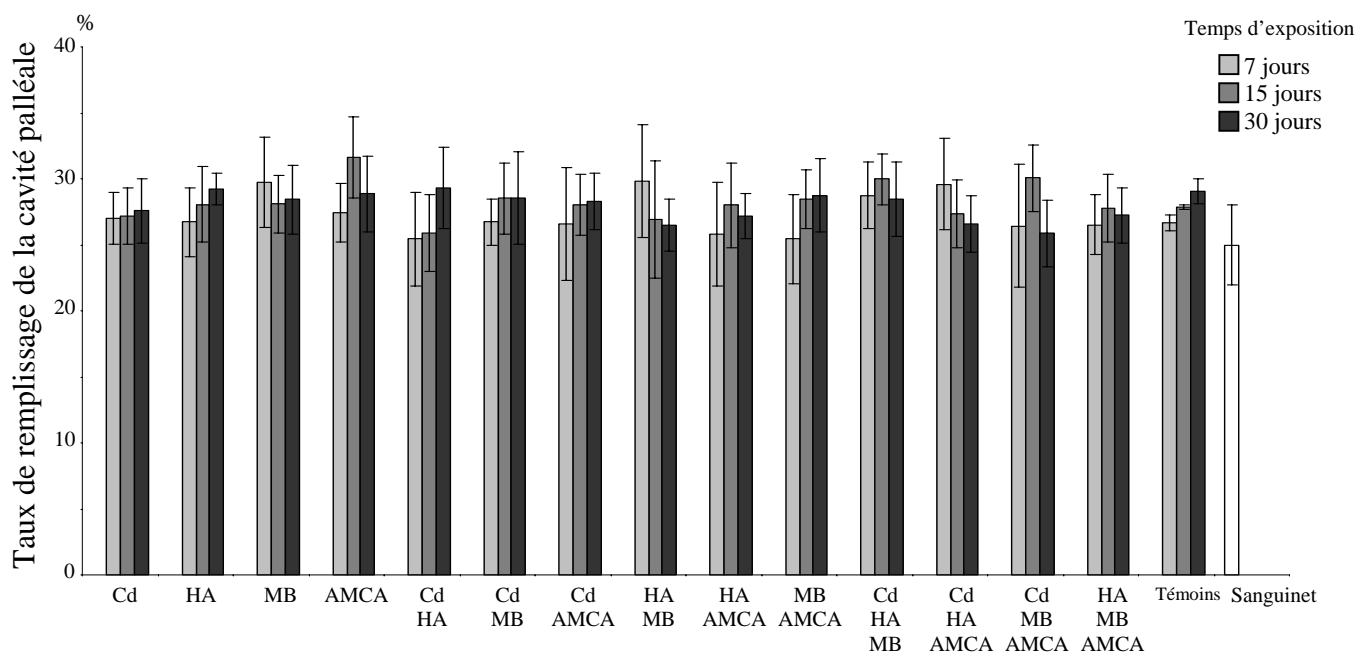


Figure 58 : Indices de condition représentés par le taux de remplissage de la cavité palléale pour chaque condition d'exposition à 7, 15 et 30 jours et lors du prélèvement sur le site du lac de Cazaux-Sanguinet.

(Cd : cadmium, HA : huile anthracénique, MB : méthyl parathion, AMCA : acide monochloracétique)

IV.B.2.5.c Activité de phagocytose des hémocytes

Après 7 jours d'exposition, les hémocytes des animaux exposés au cadmium seul et au mélange HA/AMCA présentent une stimulation de l'activité de phagocytose (Figure 59), alors que ceux des animaux exposés au mélange Cd/MB/AMCA ont une activité inhibée ($P < 0,05$). Après 15 jours, la stimulation a également été observée chez les animaux exposés à certains mélanges binaires Cd/AMCA et HA/MB, mais surtout chez les animaux exposés aux mélanges ternaires. Après 30 jours, l'activité de la phagocytose des hémocytes est globalement inférieure à celle observée après 15 jours d'exposition. Une différence significative de l'activité de phagocytose par rapport aux témoins est observée chez les animaux exposés aux mélanges ternaires HA/MB, Cd/HA/AMCA et Cd/MB/AMCA.

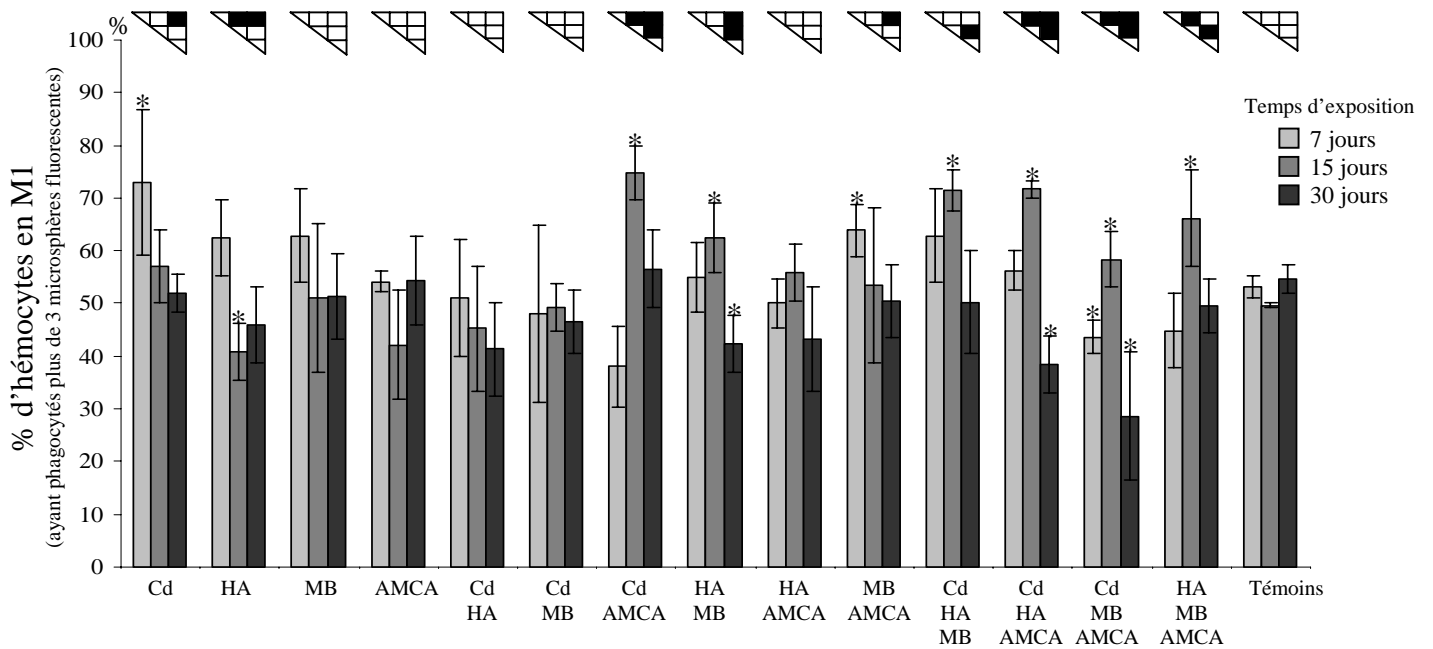


Figure 59 : Activité de phagocytose des hémocytes de *Corbicula fluminea*

Les différences significatives ($P < 0,05$) entre les paires de moyennes, pour un même type de contamination, sont indiquées par des carrés noirs dans la matrice triangulaire. Les différences significatives ($P < 0,05$) par rapport aux témoins pour un temps donné sont indiquées par un astérisque.

(Cd : cadmium, HA : huile anthracénique, MB : méthyl parathion, AMCA : acide monochloracétique)

IV.B.2.5.d Réponse des lysosomes

Les variations des paramètres stéréologiques par rapport aux témoins, au cours des 3 temps de prélèvements (Figure 60) peuvent être résumées ainsi (Tableau 14) :

	Cd	HA	MB	AMCA	Cd HA	Cd MB	Cd AMCA	HA MB	HA AMCA	MB AMCA	Cd HA MB	Cd HA AMCA	Cd MB AMCA	HA MB AMCA
Vv	↗	↗	↗	ns	↗	↗	↗	↗	↗	ns	↗	↗	↗	↗
Sv	↗	↗	ns	ns	ns	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗
S/V	↘	↘	↘	↘	ns	ns	↘	ns	↘	↗	↘	ns	ns	↘
Nv	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗

Tableau 14 : Variations des paramètres stéréologiques au cours du temps

Augmentation (↗) et diminution (↘) significatives du paramètre par rapport aux témoins, ns : variation non significative par rapport aux témoins

On constate que sur les 4 produits purs testés, seuls le cadmium et l'huile anthracénique provoquent des variations significatives des paramètres stéréologiques par rapport aux témoins. Les lysosomes des animaux exposés à ces produits augmentent en taille (traduit par une augmentation de Vv, Sv et une diminution de S/V) (Figure 60A, B, C) et sont plus nombreux (augmentation de Nv) (Figure 60D). Cependant, si on compare les différents paramètres mesurés pour une même une même

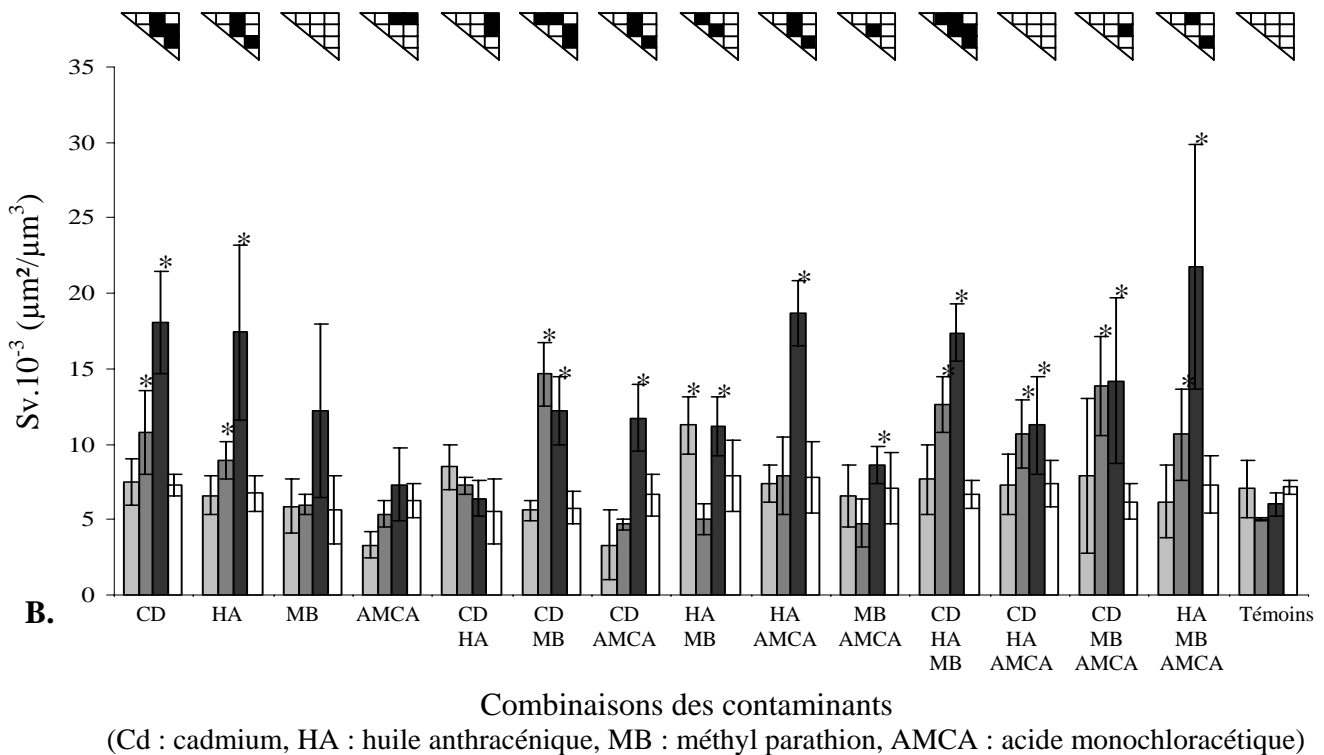
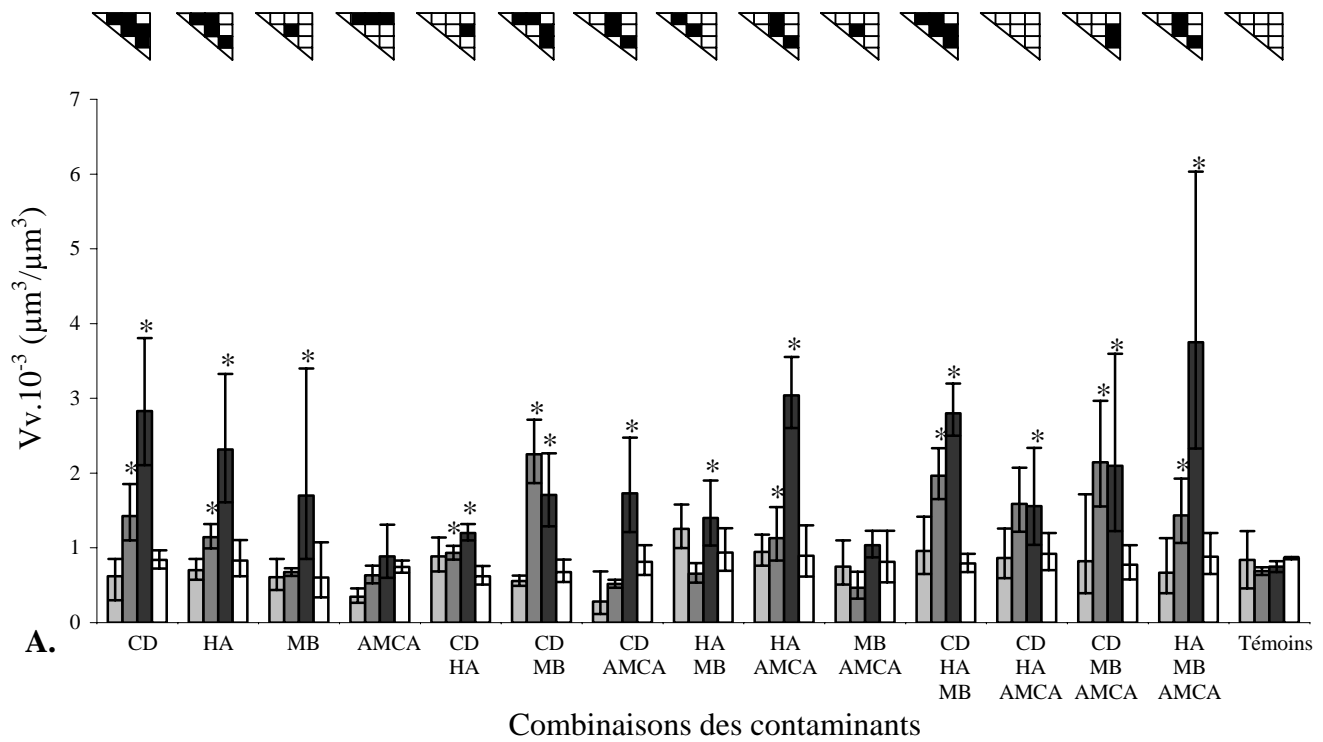
exposition, les variations sont significatives au cours du temps (AMCA, MB). Ces variations sont cependant moindres que pour le cadmium et l'huile anthracénique.

Pour les mélanges binaires, les lysosomes des animaux exposés à Cd/MB et HA/AMCA augmentent de taille et sont également plus nombreux. Il semblerait que dans le cas de l'exposition à MB/AMCA, les lysosomes ne subissent qu'une diminution de taille (diminution de S/V) après 15 jours d'exposition avant de revenir à la normale.

Pour les mélanges ternaires, les effets les plus forts sont rapportés pour les animaux exposés au mélange Cd/HA/MB avec à la fois une augmentation de la taille et du nombre de lysosomes. On observe les mêmes variations chez les animaux exposés au mélange HA/MB/AMCA, puis ceux exposés au mélange Cd/MB/AMCA avec des variations des paramètres stéréologiques un peu moins importants. Le dernier groupe de mélange ternaire, Cd/HA/AMCA, ne présente qu'une augmentation de la taille des lysosomes (diminution de S/V) ((Figure 60C) après 15 jours d'exposition.

Pour ce biomarqueur, des animaux ont été laissés 7 jours après l'arrêt de la contamination pour observer leur niveau de récupération. Cela a permis de constater qu'une fois la pression de contamination retirée, les paramètres stéréologiques reviennent à un niveau proche de celui observé chez les témoins.

Les témoins, quant à eux, subissent très peu de variations. Il n'y a pas de variations significatives de Vv et Sv (Figure 60A, B) tout au long de l'exposition. Seul le témoin n°1 exprime une variation de la taille des lysosomes (diminution de S/V) (Figure 60C) après 15 jours d'exposition et une augmentation du nombre de lysosomes (ainsi que le témoin n°2).



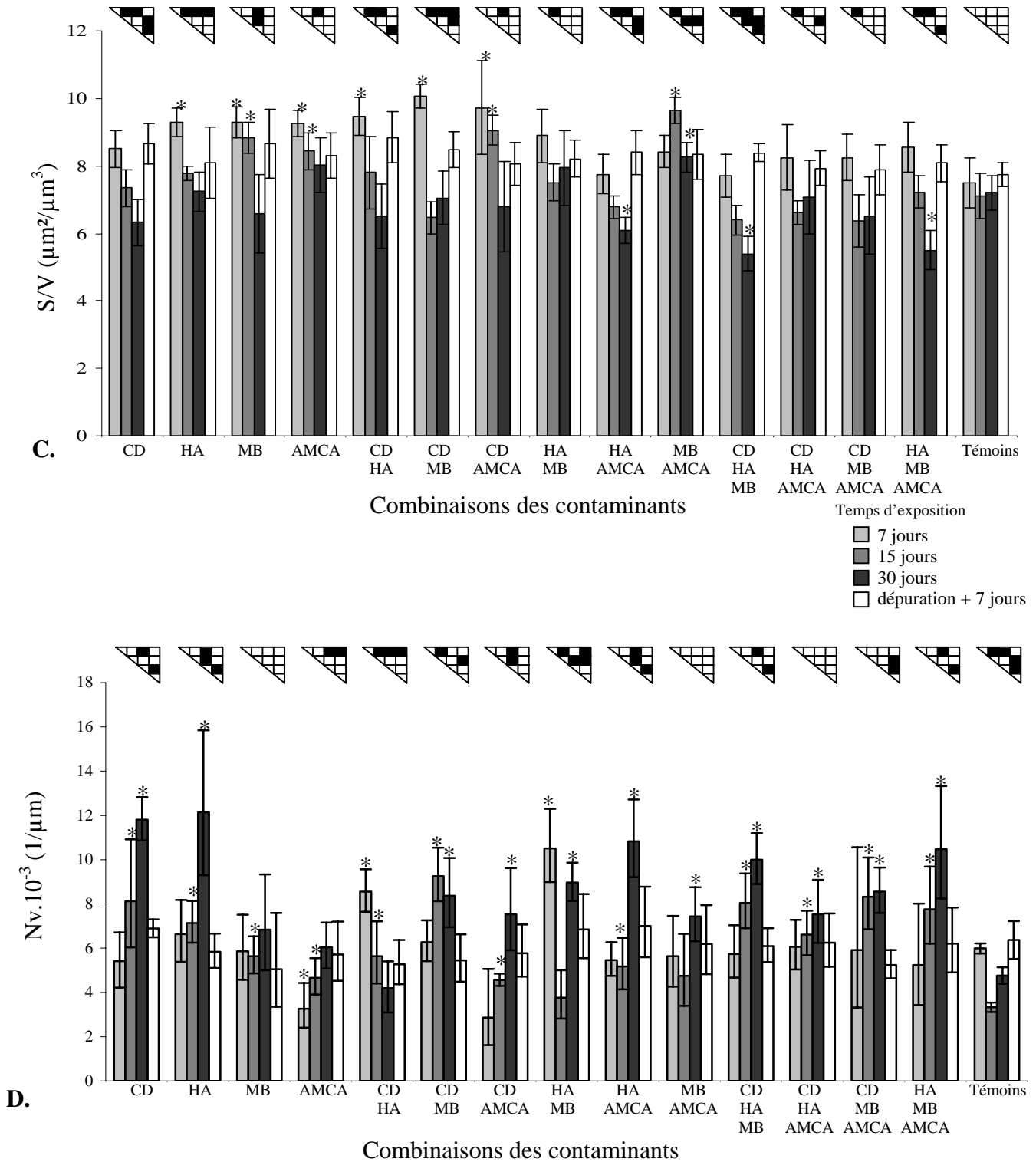


Figure 60 : Résultats de la mesure des paramètres stéréologiques des lysosomes de la glandes digestive des palourdes d'eau douce pour les différentes conditions d'exposition après 7, 15 et 30 jours et après 7 jours de dépuration.

A. densité volumique lysosomiale (V_v), **B.** densité surfacique lysosomiale (S_v), **C.** rapport des densités surfacique et volumique (S/V), **D.** densité numérique lysosomiale (N_v). Les différences significatives entre les paires de moyennes ($P < 0,05$) pour un type de contamination sont représentées par des carrés noirs dans les matrices triangulaires supérieures. Les différences significatives par rapport aux témoins ($P < 0,05$) sont indiquées par un astérisque.

(Cd : cadmium, HA : huile anthracénique, MB : méthyl parathion, AMCA : acide monochloracétique)

IV.B.2.5.e 8-oxodG

Dès 7 jours d'exposition, les animaux expriment des taux de 8-oxodG significatifs lorsqu'ils sont exposés à des produits purs (Cd, MB), à des mélanges binaires (Cd/HA, HA/MB) et ternaires (Cd/HA/MB, HA/MB/AMCA). Après 15 et 30 jours d'exposition, seuls les animaux exposés aux mélanges ternaires expriment dans leurs branchies des taux de 8-oxodG significativement supérieurs aux témoins. Après 15 jours d'exposition, les taux sont plus élevés chez les animaux exposés au Cd/HA/MB, et au Cd/MB/AMCA. Après 30 jours, ce sont ceux exposés au Cd/HA/MB et HA/MB/AMCA qui présentent la réponse la plus importante.

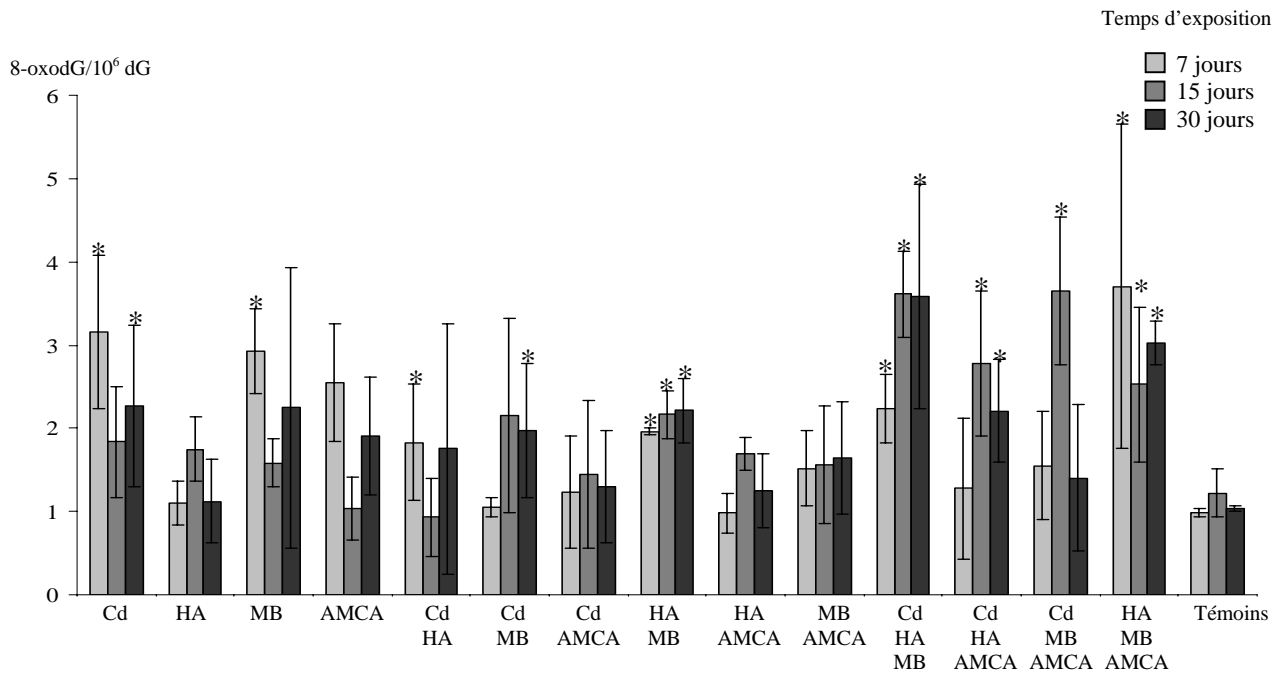


Figure 61 : Taux de 8-oxodG pour 10^6 bases normales dans les branchies de *C. fluminea* (Cd : cadmium, HA : huile anthracénique, MB : méthyl parathion, AMCA : acide monochloracétique)

IV.B.2.6 Discussion

Les études en mésocosmes ont essentiellement été conduites sur des vertébrés (Propst, *et al.*, 1999), des plantes et très peu sur des invertébrés. Ces mésocosmes nous ont permis d'être aussi près que possible des conditions environnementales.

Les divers produits chimiques seuls ou en combinaison ont induit des réponses chez les différents biomarqueurs d'effets testés. Ces réponses ont essentiellement eu lieu dans les expositions aux mélanges ternaires, ensuite aux produits purs et aux mélanges binaires.

- **Indices de conditions**

Lors de cette exposition à long terme, l'état général de l'organisme a été mesuré grâce à l'indice de condition. Une diminution de cet indice montrerait que l'animal ne peut maintenir ses réserves nutritives et par conséquent implique une diminution des activités physiologiques et biochimiques. Dans notre cas, l'indice de condition ne présente pas de différences significatives au cours de l'exposition entre les animaux témoins et ceux exposés aux xénobiotiques. Cependant cet

indice, représenté par le taux de remplissage de la cavité palléale, est fortement influencé par les variations saisonnières. En effet, pendant les mois d'hiver l'animal a un métabolisme ralenti. En été, toutes les activités ont repris pour assurer la reproduction. Pendant cette période, l'animal va se nourrir en plus grande quantité pour permettre le développement des gonades qui vont alors prendre de plus en plus de place dans la masse viscérale (Baudrimont, *et al.*, 1997a), les tendances à l'augmentation des IC au cours du temps sont plus visibles (Figure 62). Sur ce graphique, seuls les animaux exposés à l'huile anthracénique (HA) n'ont pas vu leur indice de condition augmenter significativement après 30 jours.

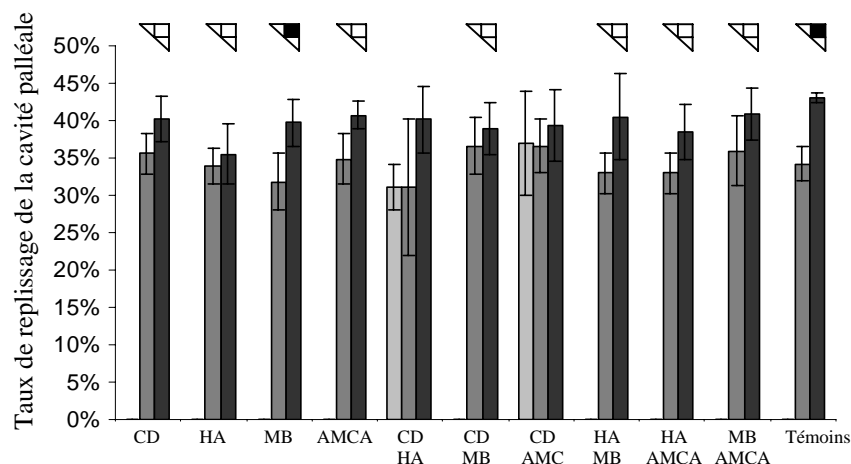


Figure 62 : Indices de condition (représentés par le taux de remplissage de la cavité palléale) chez des *C. fluminea*.

Le plan expérimental est identique que celui décrit précédemment à la différence que cette exposition n'a été conduite que sur des produits purs et en mélanges binaires pendant les mois d'été (juin-juillet). Les différences significatives entre les paires de moyennes ($P < 0,05$) pour un type de contamination sont représentées par des carrés noirs dans les matrices triangulaires supérieures.

(Cd : cadmium, HA : huile anthracénique, MB : méthyl parathion, AMCA : acide monochloracétique)

• Phagocytose

Diverses études menées aussi bien *in vitro* avec des hémocytes (Olabarrieta, *et al.*, 2001), *in vivo* en laboratoire (Fournier, *et al.*, 2002) et sur le terrain lors de l'évaluation de l'impact d'une pollution (Blaise, *et al.*, 2002a), ont montré que la phagocytose pouvait être modulée par des xénobiotiques soit en stimulation soit en inhibition (Tableau 3 p.58); toute variation par rapport à la normale étant considérée comme un effet.

Les produits purs et les mélanges ne semblent pas provoquer d'effet sur la phagocytose après 7 jours d'exposition, à l'exception du cadmium qui entraîne une stimulation. Après 15 jours d'exposition, tous les mélanges ternaires et quelques mélanges binaires provoquent une activité significativement plus élevée que celle des témoins. Après 30 jours d'exposition, un début d'inhibition de la phagocytose peut être observé.

La phagocytose réclame la mise en action de la machinerie cellulaire avec notamment des processus de signalisation cellulaire où les messagers voient leur concentration modulée (par exemple le Ca^{2+}) (Meera, *et al.*, 1993). Les stimulations de l'activité de phagocytose relevées pour certaines conditions peuvent s'expliquer par le fait qu'à faible dose, les métaux lourds, comme le cadmium, induisent une immunostimulation (phénomène d'hormèse) (Sauvé, *et al.*, 2002). L'immunostimulation est considérée comme une réponse cellulaire à un stress. Les hydrocarbures et les pesticides, quant à eux, provoquent une inhibition de la phagocytose (Lorteau, *et al.*, 1995; Grundy, *et al.*, 1996a; Olabarrieta, *et al.*, 2001).

Le mélange induisant le plus souvent une réponse implique souvent le cadmium et l'AMCA. L'AMCA peut en plus agir sur les tissus en provoquant une inflammation et donc une mobilisation des hémocytes. Cependant, sur une exposition à long terme, les effets de stimulation ne durent pas. Les systèmes s'épuisent et on assiste à une immunodépression à la suite de cette stimulation. Cependant, pour les concentrations très faibles (qui correspondent à des LOEC déterminées dans des expérimentations préliminaires) appliquées ici, les effets sont obtenus majoritairement lors des mélanges ternaires.

- **Réponses des lysosomes**

Ces 25 dernières années, de nombreuses études effectuées chez les vertébrés ont montré que les lysosomes de la glande digestive pouvaient accumuler et entraîner des réponses à diverses classes de polluants (organochlorés, PCB, HAP, métaux lourds tels que le Cr, Cu, Pb et Zn et les organométalliques tel le TBT). Les effets des métaux lourds tels Cu, Cd, Hg, Zn et des radionucléides (U^{238} , Pu^{239} et Am^{241}) sur les lysosomes ont été validés comme biomarqueurs de polluants (Regoli, 1992) ainsi qu'en tant que biomarqueurs de stress plus généraux (chaleur, salinité, UV) sur le terrain et chez diverses espèces d'invertébrés (Soto & Marigómez, 1997; Walsh & O'Halloran, 1998; Camus, *et al.*, 2000).

Chez les mollusques, la glande digestive représente un des organes cibles principaux pour l'accumulation des polluants. Avec l'utilisation de diverses approches méthodologiques, les réponses du système lysosomal des cellules digestives au cours de l'évaluation de la pollution dans les écosystèmes marins ont attiré l'attention (Etxeberria, *et al.*, 1995a; Lowe, *et al.*, 1995b; Hauton, *et al.*, 2001; Da Ros, *et al.*, 2002). De nombreuses études, sur le terrain et en laboratoire, ont permis de montrer que les multiples stress environnementaux (xénobiotiques métalliques et organiques, stress thermiques, hypoxie, salinité, espèces réactives de l'oxygène) peuvent causer 2 types de réponses dans les glandes digestives des mollusques : une réduction de la stabilité membranaire et des changements structuraux des lysosomes (Moore, 1976; Lowe, *et al.*, 1981; Cajaraville, *et al.*, 1989; Svendsen & Weeks, 1995).

Les expositions à des contaminants au cours de transplantations à court ou à long terme ainsi que les études sur le terrain ont montré que la classe des composés organiques, comprenant les HAP et les organochlorés, exercent dans les glandes digestives d'invertébrés, de nets effets au détriment des fonctions lysosomiales. Les effets de leur combinaison avec des métaux lourds sur l'intégrité de la membrane et le stockage des lipofuscines ont pu être décrit chez le bigorneau (*Littorina littorea*), la palourde (*Perna viridis*), l'huître (*Crassostrea virginica*) et la moule bleue (*Mytilus edulis*) (Viarengo, *et al.*, 1985; Moore, *et al.*, 1987).

Chez les poissons, la fuite des enzymes lysosomiales coïncide avec l'induction des enzymes du système du cytochrome P450 lors de la biotransformation des xénobiotiques (Köhler & Pluta, 1995). Ces systèmes sont connus pour produire des espèces réactives de l'oxygène et en conséquence l'induction de la peroxydation des lipides des membranes cellulaires, incluant celles des lysosomes (Winzer, *et al.*, 2000). La formation des espèces réactives de l'oxygène peut aussi s'effectuer à l'intérieur même des lysosomes, les xénobiotiques ingérés pouvant réagir entre eux (Cu, HAP). Les HAP sont attaqués par des ions métalliques déjà présents à l'intérieur des lysosomes (production des anthraquinones) puis sont engagés dans les cycles redox. Des réactions d'oxydation intralysosomiales, catalysées par le fer, associées à des dommages membranaires et des fuites d'enzymes hydrolytiques ont pu être observées. Regoli, *et al.* (1998) ont noté, chez les coquilles Saint-Jacques d'Antarctique (*Adamussium colbecki*) exposées à des métaux, une perte dramatique d'enzymes antioxydantes cytosoliques, glutathion *S*-transférase et catalase, associée à une réduction de la stabilité de la membrane lysosomiale. Les attaques des espèces

réactives de l'oxygène peuvent survenir des deux côtés de la membrane lysosomiale, de l'intérieur du lysosome et de l'extérieur depuis le cytoplasme.

- **8-oxodG**

D'une oxydation du pool de bases dG normales aussi faible que 0,0001% peut résulter d'un doublement de mesure du taux de 8-oxodG (Helbock, *et al.*, 1999). Les valeurs obtenues chez les témoins (1 base oxydée pour 10^6 dG normales) correspondent à celles mesurées avec la méthode chaotrope dans les cellules de foie de rat (Helbock, *et al.*, 1998). Cependant, les valeurs obtenues ici sont très inférieures à celles retrouvées avec la même méthode (au NaCl) sur les branchies de moules (12 8-oxodG/ 10^6 dG) (Morin, *et al.*, 2003).

Le cadmium peut induire la formation de 8-oxodG, augmenter l'activité des enzymes antioxydantes associées au noyau et provoquer des cassures à l'ADN. La corrélation entre la formation de 8-oxodG et les cassures de l'ADN indique que la 8-oxodG peut être le facteur majeur conduisant à ces cassures lorsque les cellules sont en contact avec du cadmium. Celui-ci peut également altérer la synthèse, la réparation et la fidélité de la réplication de l'ADN, et contribuer ainsi à d'autres dommages (Mikhailova, *et al.*, 1997).

La suppression de ces lésions à l'ADN est effectuée par le système d'excision-réparation des nucléotides qui agit généralement sur les macro-adduits de l'ADN. On peut s'attendre à ce que le plomb et le cadmium augmentent également la génotoxicité lorsqu'ils sont combinés à d'autres agents endommageants (Hartwig, 1994). Les résultats d'expérimentations *in vitro* indiquent que, en raison de sa capacité à s'apparier à l'adénine, la 8-oxodG ne serait pas une lésion létale mais plutôt mutagène (Wallace, 2002). Comme cette lésion peut être transmise aux générations suivantes, il est important de connaître la quantité de base oxydée formée.

Divers travaux ont étudié les dommages du radical OH⁻ sur l'ADN et ont conclu que de tels dommages sont très sélectifs (Aruoma, *et al.*, 1989; Halliwell & Aruoma, 1991). Ils ont montré que les taux de 8-oxodG augmentaient de façon appréciable au-dessus du bruit de fond lorsque l'ADN était exposé au radical OH⁻. La 8-oxodG a donc été retenue comme un marqueur pour les dommages de l'ADN par oxydation des bases (Shigenaga, *et al.*, 1994).

IV.B.2.6.a Comparaison mortalité/biomarqueurs

Si l'on compare les changements significatifs des biomarqueurs testés par rapport aux mortalités mesurées, on remarque que les réponses des biomarqueurs obtenues à un temps donné sont suivies d'une mortalité d'individus au temps suivant (Tableau 15).

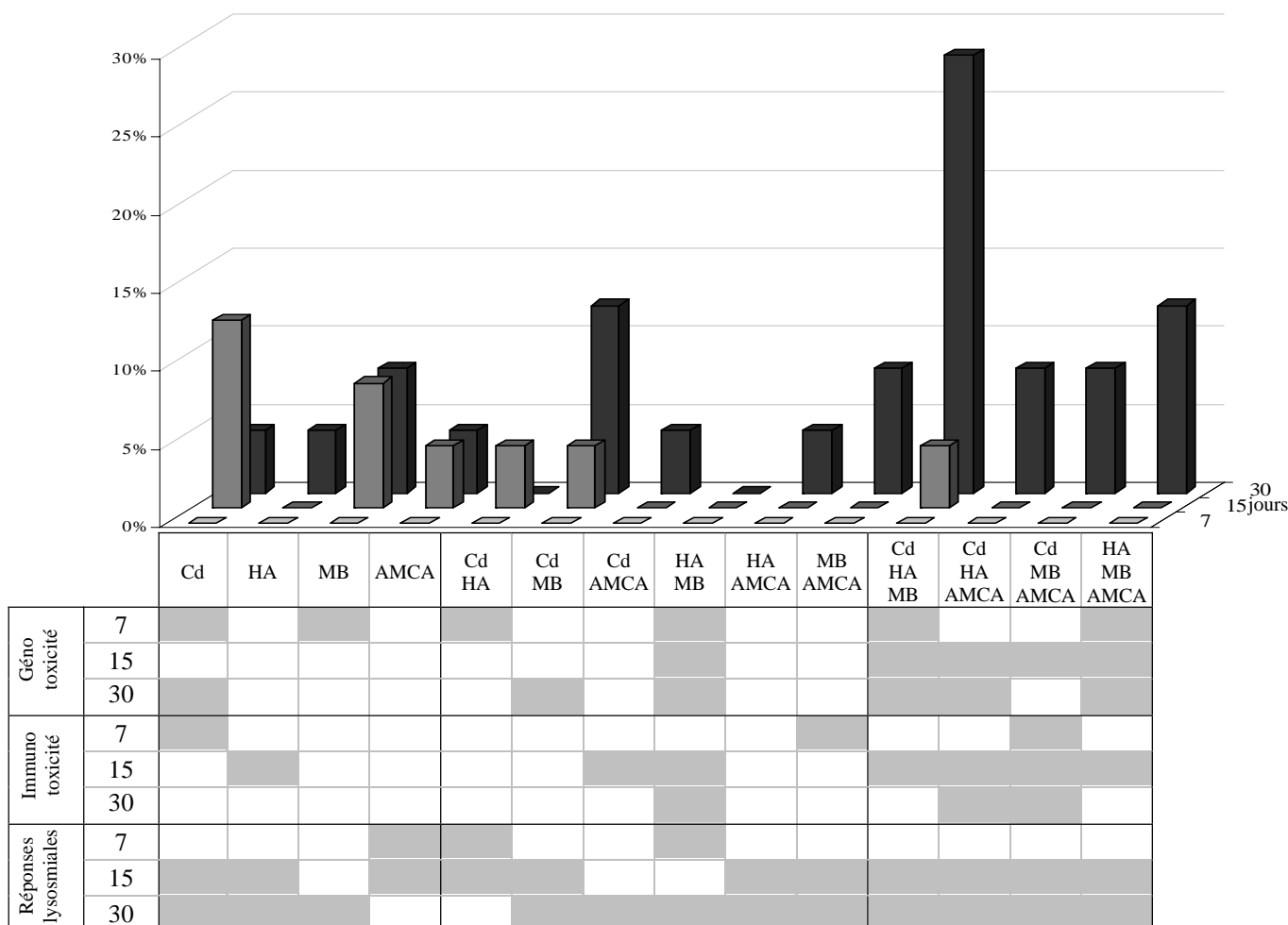


Tableau 15 : Comparaison mortalité/réponses des biomarqueurs d'effets

Les valeurs significatives des différents biomarqueurs testés (carrés gris)

(Cd : cadmium, HA : huile anthracénique, MB : méthyl parathion, AMCA : acide monochloracétique)

Dans certains cas, même si les résultats ne sont pas statistiquement significatifs (par exemple MB/AMCA), un changement de taille des lysosomes a précédé la mortalité. Donc, la variation d'un biomarqueur, à l'intérieur d'une même condition, peut donner des informations sur l'évolution du statut physiologique de l'animal.

IV.B.2.6.b Comparaisons de l'échelle indiciaire multimarqueurs à l'abondance des oligochètes et aux biomarqueurs d'effets

L'échelle indiciaire multimarqueurs a été appliquée aux résultats de cette expérimentation en utilisant les biomarqueurs d'expositions (NADPH réd, catalase, GST et PChE) (Tableau 16). Au cours de cette exposition chronique, on s'attend à obtenir une augmentation des valeurs des indices de l'échelle en fonction du temps (Clérandeau, *et al.*, 2003).

	Cd	HA	MB	AMCA	Cd HA	Cd MB	Cd AMCA	HA MB	HA AMCA	MB AMCA	Cd HA MB	Cd HA AMCA	Cd MB AMCA	HA MB AMCA
T7	22,5	35	41,25	47,5	32,5	31,25	33,75	31,25	40	45	25	23,75	18,75	38,75
T15	13,75	25	30	38,75	11,25	17,5	15	33,75	22,5	31,25	25	31,25	6,25	8,75
T30	45	22,5	43,75	45	37,5	31,25	16,25	67,5	53,75	48,75	35	46,25	38,75	45

Code des couleurs :
 Jaune : environnement significativement pollué
 Bleu : environnement peu pollué
 Vert : environnement modérément pollué
 Orange : environnement lourdement pollué
 Rouge : environnement hautement pollué

Tableau 16 : Echelle indiciaire multimarqueurs (données TOTAL)
 (Cd : cadmium, HA : huile anthracénique, MB : méthyl parathion, AMCA : acide monochloracétique)

On peut noter que certains indices ne suivent pas ce gradient. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer la diminution de ces indices : les défenses de l'organismes (enzymes) sont inhibées ou débordées par les xénobiotiques et/ou il y a un relais avec d'autres systèmes enzymatiques (non mesurés).

Le rapprochement avec l'abondance des oligochètes (Figure 63), permet de considérer que certains de ces indices sont des faux négatifs ; une diminution significative de l'abondance des oligochètes indique dans ce cas une détérioration du milieu (pollution).

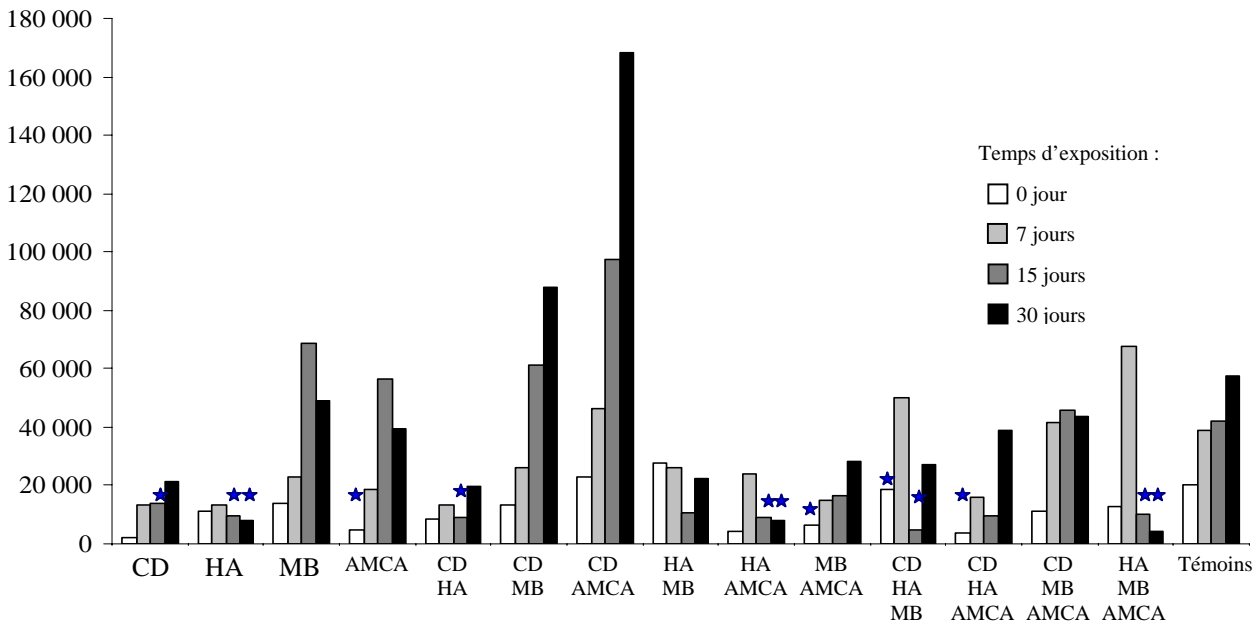


Figure 63 : Abondance des oligochètes (données TOTAL)

Les étoiles indiquent une diminution significative ($P < 0,05$)

(Cd : cadmium, HA : huile anthracénique, MB : méthyl parathion, AMCA : acide monochloracétique)

Les biomarqueurs d'effets permettent également de mettre en évidence les faux négatifs. En effet, si on obtient un indice de pollution qui ne semble pas cohérent, alors que les biomarqueurs d'effets répondent significativement on peut penser qu'on a affaire à des faux négatif (Tableau 15). Ceux-ci peuvent également être détectés à l'aide des variations des biomarqueurs d'effets pour une condition donnée, sans pour autant qu'elles soient significatives par rapport au témoin (par exemple, variations significatives des paramètres stéréologiques au cours du temps pour un mélange donné, mais non significatives par rapport au témoin).

En reportant sur l'échelle indiciaire à la fois les faux négatifs, confirmés par les diminutions significatives de l'abondance des oligochètes, et ceux confirmés par les réponses des biomarqueurs d'effets (Tableau 17), on observe qu'ils se superposent souvent.

	Cd	HA	MB	AMCA	Cd HA	Cd MB	Cd AMCA	HA MB	HA AMCA	MB AMCA	Cd HA MB	Cd HA AMCA	Cd MB AMCA	HA MB AMCA
T7	22,5	35	41,25	47,5	32,5	31,25	33,75	31,25	40	45	25	23,75	18,75	38,75
T15	13,75	25	30	38,75	11,25	17,5	15	33,75	22,5	31,25	25	31,25	6,25	8,75
T30	45	22,5	43,75	45	37,5	31,25	16,25	67,5	53,75	48,75	35	46,25	38,75	45

Tableau 17 : Echelle indiciaire multimarqueurs avec report des faux négatifs

■ faux négatifs confirmés à partir de l'abondance oligochètes
 ○ faux négatifs confirmés à partir des biomarqueurs d'effets

Les réponses de communautés sont plus tardives que celles des biomarqueurs (Figure 2) ; les faux négatifs, confirmés uniquement avec les biomarqueurs d'effets (Cd/MB, Cd/AMCA, Cd/MB/AMCA), peuvent être dus à cette cause.

IV.B.2.7 Conclusion

L'exposition de *C. fluminea* à des substances pures et en mélanges, nous a permis d'évaluer les réponses des marqueurs en milieu naturel. Les diverses substances utilisées ont un impact beaucoup plus important sur l'animal lorsqu'elles sont en mélanges ternaires, montrant la potentialisation de ces produits les uns avec les autres. L'approche multimarqueurs a permis également d'obtenir une certaine prédiction de la mortalité des individus de *C. fluminea* exposés. La prédiction de ces marqueurs sur la mortalité est d'autant plus intéressante que, bien que précédant la mortalité, en retirant le stress induit par les xénobiotiques (cas de la mise en dépuración), ces marqueurs retrouvent un niveau comparable aux témoins. Il semble donc que l'irréversibilité d'une atteinte soit un phénomène extrême.

Cette expérimentation nous a permis de valider l'utilisation des réponses des marqueurs pour la surveillance du milieu dulçaquicole.

IV.B.3 Conclusion sur les expositions en mésocosmes

Ces deux types d'exposition dans les rivières artificielles nous ont permis de valider l'utilisation des marqueurs sélectionnés en tant que **biomarqueurs d'effets** sur *C. fluminea* : **la mesure de l'activité de phagocytose avec deux techniques, les changements structuraux des lysosomes et la 8-oxodG.**

Les deux expérimentations effectuées dans les Rivières Pilotes ont été menées à deux périodes de l'année, en été pour l'exposition au MAM et en hiver pour l'exposition aux mélanges révélant la variabilité saisonnière des biomarqueurs.

Variabilité des réponses de l'activité de phagocytose

Les bivalves sont des animaux poïkilothermes et donc sujets aux variations physico-chimiques du milieu (salinité en milieu marin, dureté en milieu dulçaquicole, température, ...). Ces variations peuvent entraîner des modifications dans les activités de défense des hémocytes (Fisher, 1988) ainsi que dans les autres fonctions remplies par les hémocytes.

Les changements physiologiques associés au cycle de reproduction des bivalves sont liés à la température et donc à la saison. Par exemple, les moules (*Mytilus edulis*) collectées dans la lagune de Venise avaient une densité d'hémocytes plus faible en été, pendant la période de ponte, par rapport à l'hiver et au printemps (Pipe, *et al.*, 1995). Des modifications dans le cycle de reproduction peuvent influencer l'accumulation de contaminants dans l'organisme.

La nutrition joue également un rôle dans ces variations. Chez les bivalves intertidaux qui arrêtent de se nourrir à marée basse, les tubules digestifs ont des épithéliums plus fins avec des lumens importants. Ceux des bivalves subtidales, qui peuvent se nourrir en continu, ont des lumens plus étroits (Morton, 1970). L'atrophie du tubule digestif chez certains bivalves peut être associée à un stress d'une exposition à un xénobiotique (Couch, 1984) ou à une alimentation insuffisante (Winstead, 1995). Les hémocytes migrent habituellement dans l'intestin pour participer à la dégradation des nutriments. Ils vont phagocyter et digérer les aliments mais ils peuvent être influencés par le statut alimentaire. Lors d'un jeûne prolongé, ils vont être mobilisés depuis l'hémolymph vers les tissus pour les digérer et compenser un manque de nutriments.

Les hémocytes ont donc un rôle prépondérant chez les mollusques. Une altération de ce compartiment va remettre en cause la survie à long terme de l'individu et donc de la population lors des contaminations à grande échelle. La mesure de leur activité est donc un excellent biomarqueur d'effets.

Variabilités des réponses des lysosomes

Des mesures des variations saisonnières des lysosomes de la glande digestive chez des moules *M. galloprovincialis* (Etxeberria, *et al.*, 1995b) ont permis de montrer une différence entre été-automne et hiver-printemps. L'influence de la température sur le milieu est donc primordiale source de stress (Moore, 1976). Cependant, dans notre cas, la température des eaux circulant dans les canaux restent à des valeurs inférieures à celles de leur lieu de prélèvement (lac de Sanguinet) pour les mêmes périodes (Vidal, *et al.*, 2002).

Le processus de ponte influence les lysosomes de la glande digestive (Bayne, *et al.*, 1978; Cajaraville, *et al.*, 1991). Chez *C. fluminea*, les variations saisonnières du statut reproductif (Vidal, *et al.*, 2002) indiquent une chute du nombre d'ovocytes dans les gonades entre le mois de mai et de septembre, avec une augmentation du nombre de larves dans les branchies. La température de l'eau influe (Vidal, *et al.*, 2002) sur le cycle de reproduction. Les animaux exposés à l'eau du Gave de Pau ont leur cycle de reproduction retardé par rapport aux animaux du lac de Sanguinet dont l'eau est plus chaude à la même période.

La disponibilité de la nourriture peut également avoir une influence sur les changements structuraux des lysosomes (Etxeberria, *et al.*, 1995b).

Les valeurs des paramètres stéréologiques des témoins des 2 expositions en mésocosme (MAM et mélanges), sont très proches, laissant présumer que les variations observées sont essentiellement dues aux contaminants et non aux variations de l'environnement.

Conclusion générale

V Conclusion générale

Le but de cette étude prospective était de déterminer des marqueurs biologiques susceptibles de devenir des biomarqueurs d'effets chez *Corbicula fluminea*, pour pouvoir définir le statut physiologique de l'animal.

Pour ce travail, proposé dans le cadre d'un projet de validation des biomarqueurs chez *C. fluminea* pour leur utilisation *in situ*, nous avons choisi des marqueurs d'effets génotoxiques, immunotoxiques, reprotoxiques et généraux. A l'issue de nos études en laboratoire en conditions contrôlées et semi-contrôlées, certains marqueurs ont été validés en tant que biomarqueurs d'effets, selon les critères de sensibilité, précocité et reproductibilité, alors que d'autres ont été écartés (Tableau 18). La plupart des marqueurs écartés nécessitent un développement complémentaire approfondi.

Paramètres	Utilisation comme biomarqueur d'effets chez <i>C. fluminea</i>
Génotoxicité	
Bases oxydées (8-oxodG)	▲
<i>DNA unwinding</i>	×
Immunotoxicité	
Phagocytose (microbilles)	✓
Phagocytose (levures)	✓
Reprotoxicité	
Phosphates labiles en milieu alcalin	×
Histologie des gonades	×
Etat général	
Changements structuraux des lysosomes	✓
Stabilité lysosomiale	×
Indice de condition (taux de remplissage de la cavité palléale)	×

Tableau 18 : Récapitulatif des paramètres retenus comme biomarqueurs d'effets chez *C. fluminea* (✓ : retenu comme biomarqueur d'effet, × : non retenu, ▲ : utilisation terrain)

Génotoxicité

Les essais sur les organismes entiers ou sur les masses viscérales n'ont pas permis d'obtenir de l'ADN suffisamment purifié (exempt de protéines) pour être analysé. En revanche, les faibles taux de 8-oxodG obtenus sur les branchies des organismes témoins, indiquent une faible quantité d'artéfacts induits et donc que le protocole proposé est adapté à cet organisme. Cependant, les réponses de ce biomarqueur s'avèrent plus pertinentes lorsqu'il est utilisé lors des conditions semi-contrôlées.

L'autre technique proposée pour évaluer la génotoxicité, le *DNA unwinding*, nécessite encore une mise au point approfondie ; la détermination des niveaux de base d'ADN simple-brin, essentiels pour la conduite de ce test, reste à optimiser. De plus, ce test nécessite le traitement d'échantillons frais, ce qui le rend peu adapté aux études sur le terrain.

Immunotoxicité

Le développement de l'**activité de phagocytose** des hémocytes chez *C. fluminea* a établi que ce test était d'application aisée. L'observation simultanée d'une perturbation de l'architecture du cytosquelette et d'une diminution de l'activité de phagocytose liée à la dose de xénobiotique, autorise l'utilisation de ce marqueur comme biomarqueur d'effets immunotoxiques chez *Corbicula fluminea*. Les deux techniques d'évaluation, équivalentes, ont été utilisées en fonction des contraintes liées à l'expérimentation. Lorsque les échantillons ont pu être traités immédiatement sans conservation, l'utilisation d'un lecteur de microplaques a été privilégiée et lorsqu'il a été nécessaire de conserver les échantillons nous avons utilisé un cytomètre en flux.

Les variations mesurées, stimulation ou inhibition de la phagocytose, sont considérées comme une réponse. En effet, ce marqueur peut donner des réponses de type hormétique : certaines substances (comme le cadmium) administrées à faible dose ont une action stimulante alors qu'à plus forte dose, elles exercent un effet inhibiteur. De plus, il semble que le lien bidirectionnel entre le système immunitaire et le système hormonal puisse exister chez *C. fluminea*. En effet, l'activité de phagocytose semble influencée par les hormones.

Des expositions chroniques à des concentrations sublétales de xénobiotiques peuvent prédisposer les individus à une plus grande susceptibilité aux agressions externes. Ce biomarqueur est donc essentiel car il reflète l'état de l'individu et sa capacité à se défendre.

Reprotoxicité

La **perturbation endocrinienne de la reproduction** n'a pas pu être démontrée de façon distincte : le caractère hermaphrodite de l'organisme étudié obligeant à adopter une approche beaucoup plus précise que le dosage des phosphates labiles en milieu alcalin et plus quantitative quant à la visualisation de coupes histologiques. Un travail approfondi sur la caractérisation des hormones de *C. fluminea* et la connaissance de leur cycle saisonnier permettrait de mettre en évidence des modifications des cycles et des taux hormonaux dans le cas d'une perturbation.

Etat général

La **réponse lysosomiale**, mesurée par les changements structuraux des lysosomes des cellules de la glande digestive, est un marqueur général d'effets de toxicité non-spécifique qui permet de cerner le statut biologique de l'animal mais nécessite du temps pour sa quantification. Par ailleurs, nous avons observé que certains composés ne semblent pas influencer les paramètres stéréologiques (MAM, 17β -œstradiol). Parallèlement à ce test, la mesure de l'épaisseur de l'épithélium digestif (Marigómez, *et al.*, 1996b) ou l'évaluation de la stabilité lysosomiale pourraient s'avérer complémentaires dans la compréhension et l'évolution de ce biomarqueur.

Dans notre cas, si la stabilité lysosomiale n'a pas donné de résultats probants avec le protocole décrit par l'UNEP, l'utilisation d'un composé fluorescent (actuellement en développement) et une quantification par analyse d'image pourrait permettre son emploi comme biomarqueur d'effets chez *C. fluminea*.

L'**indice de condition** sélectionné (taux de remplissage de la cavité palléale) ne permet pas de fournir une indication sur l'état général des individus de façon assez sensible. De plus, cet indice est trop directement lié à la saison pour pouvoir être utilisé tout au long de l'année. Cet indice intègre non seulement le statut énergétique de l'animal (plus l'animal aura besoin de lutter pour maintenir son homéostasie, plus ses réserves nutritives seront mises à contribution), mais également le statut reproductif (en période de reproduction, les gonades occupent plus de place que la glande digestive). De plus, en période hivernale, l'animal entre en période ralentie ; les ressources nutritives sont moins présentes et les conditions de développement moins favorables. Ces conditions empêchent l'observation des variations potentielles dues à l'action d'un xénobiotique.

Son utilisation ne pourrait être effective qu'en période estivale au cours de laquelle sa diminution, ou son absence d'augmentation, pourraient suggérer des perturbations physiologiques de l'animal.

L'évaluation de la santé d'un animal peut également s'apprécier par sa capacité à survivre à un stress prolongé. Le test du *stress on stress* (Viarengo, *et al.*, 1995) pourrait plus facilement convenir. Au cours de ce test, le bivalve est sorti de l'eau et son temps survie est mesuré par le temps nécessaire à l'ouverture de la coquille : moins il sera en bonne santé, moins son temps de résistance sera long.

Les biomarqueurs d'exposition et d'effets interviennent à différents niveaux d'organisation dans l'organisme et à des moments différents. Ce sont ces différences qui permettent de prévoir la mortalité des individus exposés. Cependant, pendant la réponse d'un biomarqueur d'exposition, les atteintes fonctionnelles dues à un contaminant peuvent également survenir (réponse des biomarqueurs d'effets). Les deux types de biomarqueurs peuvent alors répondre de façon simultanée, mais les biomarqueurs d'effets ont des réponses beaucoup plus linéaires que celles des biomarqueurs d'exposition face à un stress (Figure 64).

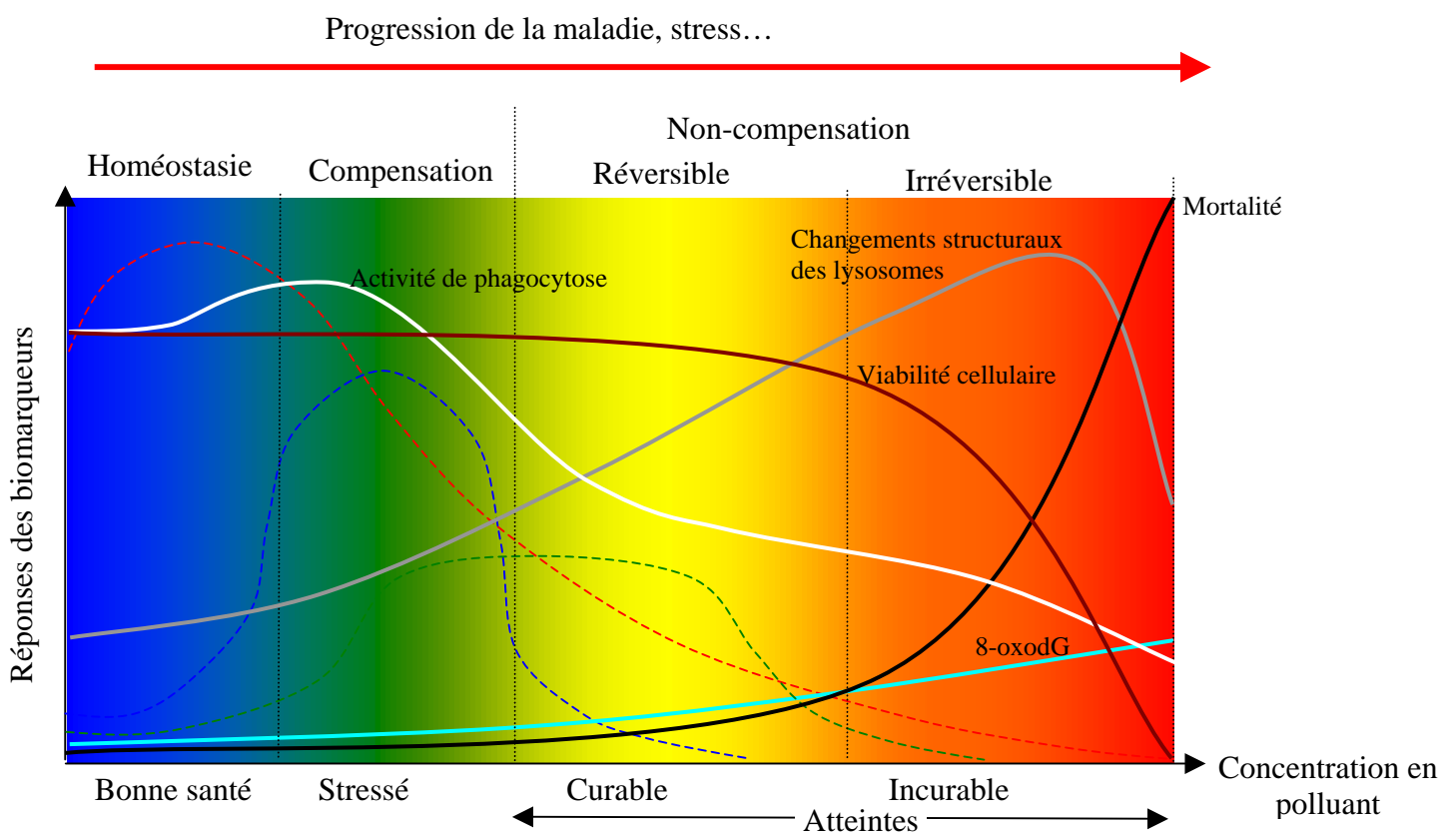


Figure 64 : Chronologie possible des réponses des biomarqueurs d'exposition et d'effets lors d'un stress subit.

ligne en pointillé : biomarqueurs d'exposition

ligne pleine : biomarqueur d'effets

en fond la gradation de couleurs indiquant la pollution de l'environnement :

- Code des couleurs :**
- Bleu : environnement peu pollué
 - Vert : environnement modérément pollué
 - Jaune : environnement significativement pollué
 - Orange : environnement lourdement pollué
 - Rouge : environnement hautement pollué

Si les biomarqueurs d'effets permettent d'évaluer les altérations pathologiques, ils nécessitent, pour la majorité d'entre eux, une mise en œuvre complexe et longue en comparaison avec les biomarqueurs d'exposition.

La comparaison des réponses des biomarqueurs d'effets avec celles d'une communauté (par exemple l'abondance des oligochètes) permet de constater que ces réponses concordent entre elles.

Finalement, une étude de terrain permettrait la validation de cet outil avec la mesure d'un panel d'indicateurs biologiques (biomarqueurs d'exposition, biomarqueurs d'effets et réponses des communautés). La mise en relation de la chronologie d'apparition des réponses des biomarqueurs et des réponses des différentes communautés d'un écosystème permettrait d'évaluer la prédictivité des réponses biomarqueurs quant à l'influence d'un contaminant sur un organisme, une population, une communauté ou un écosystème. L'intégration des biomarqueurs d'effets dans l'échelle indiciaire ou la création d'une échelle parallèle les intégrant, améliorerait l'évaluation de la qualité d'un milieu, en donnant un outil supplémentaire et complémentaire à l'échelle indiciaire multimarqueurs.

Références bibliographiques

- Aaltonen, T.M., Jokinen, E.I., Lappivaara, J., Markkula, S.E., Salo, H.M., Leppanen, H., Lammi, R.,** 2000. Effects of primary- and secondary-treated bleached kraft mill effluents on the immune system and physiological parameters of roach. *Aquatic Toxicology*, **51**(1): 55-67.
- Aarab, N.,** 2004. Les biomarqueurs chez les poissons et les bivalves: de l'exposition à l'effet et du laboratoire au terrain. Thèse de Doctorat n°ordre 2818, Université de Bordeaux 1, 234 pages.
- Aarab, N., Champeau, O., Mora, P., Daubèze, M., Garrigues, P., Narbonne, J.-F.,** 2004a. Scoring approach based on fish biomarkers applied to French river monitoring. *Biomarkers*, **9**(3): 258-270.
- Aarab, N., Minier, C., Lemaire, S., Unruh, E., Hansen, P.-D., Larsen, B.K., Andersen, O.-K., Narbonne, J.-F.,** 2004b. Biochemical and histological responses in mussel (*Mytilus edulis*) exposed to North Sea oil and to a mixture of North Sea oil and alkylphenols. *Marine Environmental Research*, **58**(2-5): 437-441.
- Aarab, N., Mora, P., Daubèze, M., Narbonne, J.-F.,** 2005. *In vitro* detection and quantification of testosterone metabolites in aquatic organisms. *Analytical Letters*, **38**(4): 629-640.
- Abok, K., Hirth, T., Ericsson, J.L., Brunk, U.,** 1983. Effect of iron on the stability of macrophage lysosomes. *Virchows Archiv B - Cell Pathology Including Molecular Pathology*, **43**(2): 85-101.
- Abu-Shakra, A. & Zeiger, E.,** 1997. Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine following treatment of 2'-deoxyguanosine or DNA by hydrogen peroxide or glutathione. *Mutation Research*, **390**(1-2): 45-50.
- Adams, S.M., Brown, A.M., Goede, R.W.,** 1993. A quantitative index for rapid evaluation of fish condition in the field. *Transactions of the American Fisheries Society*, **122**: 63-73.
- Adema, C.M., Knaap, W.P.W., Sminia, T.,** 1991. Molluscan hemocyte-mediated cytotoxicity: the role of reactive oxygen intermediates. *Review of Aquatic Science*, **4**: 201-223.
- Ahmed, S.A.,** 2000. The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disrupters): a new emerging field. *Toxicology*, **150**(1-3): 191-206.
- Akasaka, S. & Yamamoto, K.,** 1994. Hydrogen peroxide induces G:C to T:A and G:C to C:G transversions in the supF gene of *Escherichia coli*. *Molecular & General Genetics*, **243**(5): 500-505.
- Akcha, F.,** 2000. Etude de la formation d'adduits et de 8-oxodGuo à l'ADN de moule, *Mytilus sp.* : perspectives d'utilisation dans le milieu marin en tant que biomarqueurs de génotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Thèse de Doctorat N°2186, Université de Bordeaux 1, 316 pages.
- Akcha, F., Burgeot, T., Leszkowicz, A., Budzinski, H., Narbonne, J.-F.,** 2000a. Induction et élimination of bulky benzo[a]pyrene-related adducts and 8-oxodGuo in mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed *in vivo* to B[a]p-contaminated feed. *Marine Ecology Progress Series*, **205**: 196-206.
- Akcha, F., Ruiz, S., Zamperon, C., Venier, P., Burgeot, T., Cadet, J., Narbonne, J.-F.,** 2000b. Benzo[a]pyrene-induced DNA damage in *Mytilus galloprovincialis*. Measurement of bulky DNA adducts and DNA oxidative damage in term of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. *Biomarkers*, **5**(5): 355-361.
- Alamo, C., Ferrandiz, B., Lopez-Munoz, F., Alguacil, L.F.,** 1995. Influence of butibufen on enzyme activity and lysosomal stabilization *ex vivo*: a comparative study with hydrocortisone and acetylsalicylic acid. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, **17**(5): 303-310.
- Aldridge, W.N.,** 1996. Mechanisms and concepts in toxicology. London, UK, Taylor and Francis Books Ltd. 254 p.
- Allen, J.I. & Moore, M.N.,** 2004. Environmental prognostics: Is the current use of biomarkers appropriate for environmental risk evaluation? *Marine Environmental Research*, **58**(2-5): 227-232.
- Allison, A.C.,** 1974. Lysosomes. Oxford, Oxford University Press. 13 p.
- Alpha, C.X., Guthmiller, J.M., Cummings, H.E., Schomberg, L.L., Noorani, S.M.,** 2001. Molecular analysis of Peptostreptococcus micros isolates from patients with periodontitis. *J Periodontol*, **72**(7): 877-882.
- Amiard, J.C., Geffard, A., Amiard-Triquet, C.,** 1998. La métallothionéine chez la moule *Mytilus edulis* comme biomarqueur de pollution métallique: variabilité entre sites, saisons et organes. *J Rech Océanogr*, **23**: 25-30.
- Anderson, R.S., Giam, C.S., Ray, L.E., Tripp, M.R.,** 1981. Effects of environmental pollutants on immunological competency of the clam *Mercenaria mercenaria*: impaired bacterial clearance. *Aquatic Toxicology*, **1**: 187-195.

- Anderson, R.S., Oliver, L.M., Jacobs, D.**, 1992. Immunotoxicity of cadmium for the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Journal of Shellfish Research*, **14**: 317-326.
- Anderson, R.S.**, 1993. Modulation of nonspecific immunity by environmental stressors. in "*Pathobiology of marine and estuarine organisms*". Couch, J.A. & Fournie, J.W.: 483-510.
- Anderson, R.S., Brubacher, L.L., Ragone Calvo, L.M., Burreson, E.M., Unger, M.A.**, 1997. Effect of *in vitro* exposure to tributyltin on generation of oxygen metabolites by oyster hemocytes. *Environmental Research*, **74**(1): 84-90.
- Andrews, N.C.**, 1999. The iron transporter DMT1. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **31**: 991-994.
- Andrews, N.W.**, 2000. Regulated secretion of conventional lysosomes. *Trends in Cell Biology*, **10**(8): 316-321.
- Antignac, E., Koch, B., Grolier, P., Cassand, P., Narbonne, J.F.**, 1990. Prochloraz as potent inhibitor of B(a)P metabolism and mutagenicity in rat liver fractions. *Toxicology Letters*, **54**: 309-315.
- Araujo, R., Moreno, D., Ramos, M.A.**, 1993. The Asiatic clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) (Bivalvia: Corbiculidae) in Europe. *American Malacological Bulletin*, **10**(1): 39-49.
- Arnold, S.F., Klotz, D.M., Collins, B.M., Vonier, P.M., Guillette, L.J., Jr., McLachlan, J.A.**, 1996. Synergistic activation of estrogen receptor with combination of environmental chemicals. *Science*, **272**(5267): 1489-1492.
- Aruoma, O.I., Halliwell, B., Dizdaroglu, M.**, 1989. Iron ion-dependant modification of base in DNA by superoxide radical-generating system hypoxanthine/xanthine oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, **264**(22): 13024-13028.
- Ashorn, R.**, 1982. Immunomodulation in guinea pigs by porcine spleen cell dialysate. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica Section C - Immunology*, **90**(6): 339-345.
- Auffret, M., Mujdzic, N., Corporeau, C., Moraga, D.**, 2002. Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Marine Environmental Research*, **54**(3-5): 585-589.
- Babich, H. & Borenfreund, E.**, 1993. Applications of the neutral red cytotoxicity assay to risk assessment of aquatic contaminants: an overview. in "*Environmental Toxicology and Risk Assessment*". Landis, W.G., Hughes, J.S.Lewis, M.A. (Eds.). Philadelphia, American Society for Testing and Materials. **STP 1179**: 215-229.
- Baddeley, A.J.**, 1993. Stereology and survey sampling theory. *Bulletin of the International Statistics Institute, Proceedings 49th Session, Florence*, **50**(2): 435-449.
- Baird, R.H.**, 1958. Measurement of condition in mussels and oysters. *J Cons Perm Inter Explor Mer*, **23**: 249-257.
- Balouet, G. & Poder, M.**, 1979. A proposal for classification of normal and neoplastic types of blood cells in molluscs. in "*Advances in comparative leukemia research*". Yohn, D.S., Lapin, B.Blakeslee, J. (Eds.). Amsterdam, Elsevier. 568 p.
- Banerjee, B.D., Koner, B.C., Ray, A.**, 1996. Immunotoxicity of pesticides: perspectives and trends. *Indian Journal of Experimental Biology*, **34**(8): 723-733.
- Banni, M., Jebali, J., Daubèze, M., Clérendeau, C., Guerbej, H., Narbonne, J.-F., Boussetta, H.**, 2005. Monitoring pollution in Tunisian coasts: application of a classification scale based on biochemical markers. *Biomarkers*, **10**(2-3): 105-116.
- Baranyi, I.B.**, 1973. A tavikagylo (*Anodonta cygnea* L.) neuroszekrecios tevekenysegenek elektronmikroszkopos vizsgala osztradiolpropionat hatasara. *Biologi Kozl*, **21**(27-30).
- Barfield, M.L., Farris, J.L., Black, M.C.**, 2001. Biomarker and bioaccumulation responses of Asian clams exposed to aqueous cadmium. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, **63**(7): 495-510.
- Basack, S.B., Oneto, M.L., Verrengia Guerrero, N.R., Kesten, E.M.**, 1997. Accumulation and elimination of pentachlorophenol in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **58**(3): 497-503.
- Basack, S.B., Oneto, M.L., Fuchs, J.S., Wood, E.J., Kesten, E.M.**, 1998. Esterases of *Corbicula fluminea* as biomarkers of exposure to organophosphorus pesticides. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **61**(5): 569-576.
- Bassères, A. & Tramier, B.**, 2001. Characterisation of the impact of aqueous industrial waste in mesocosms: biological indicators and pilot streams. *Water Science and Technology*, **44**: 135-143.

- Bassères, A., Simonet, F., Lafont, M., Coste, M., Narbonne, J.-F.**, 2004. Validation of biomarkers for impact evaluation of aqueous industrial waste in mesocosms. *Water Science & Technology*, **49**(1): 123-130.
- Baudrimont, M., Lemaire-Gony, S., Ribeyre, F., Metivaud, J., Boudou, A.**, 1997a. Seasonal variations of metallothionein concentrations in the Asiatic Clam (*Corbicula fluminea*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, **118C**(3): 361-367.
- Baudrimont, M., Metivaud, J., Maury-Brachet, R., Ribeyre, F., Boudou, A.**, 1997b. Bioaccumulation and metallothionein response in the asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **16**(10): 2096-2105.
- Baudrimont, M., Andres, S., Durrieu, G., Boudou, A.**, 2003. The key role of metallothioneins in the bivalve *Corbicula fluminea* during the depuration phase, after in situ exposure to Cd and Zn. *Aquatic Toxicology*, **63**(2): 89-102.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P.**, 1997. Analytical procedure for the analysis of PAHs in biological tissues by gas chromatography coupled to mass spectrometry: application to mussels. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **359**: 502-509.
- Bayne, B.L., Holland, D.L., Moore, M.N., Lowe, D.M., Widdows, J.**, 1978. Further studies on the effects of stress in the adult on the eggs of *Mytilus edulis*. *Journal of Marine Biology Assoc. U.K.*, **58**: 825-841.
- Bayne, B.L.**, 1989. Measuring the biological effect of pollution: the Mussel Watch approach. *Water Science and Technology*, **21**: 1089-1100.
- Bayne, C.J., Moore, M.N., Carefoot, T.H., Thompson, R.J.**, 1979. Haemolymph functions in *Mytilus californianus*: the cytochemistry of hemocytes and their responses to foreign implants and haemolymph factors in phagocytosis. *Journal of Invertebrate Pathology*, **34**: 1-20.
- Beddowes, E.J., Faux, S.P., Chipman, J.K.**, 2003. Chloroform, carbon tetrachloride and glutathione depletion induce secondary genotoxicity in liver cells via oxidative stress. *Toxicology*, **187**(2-3): 101-115.
- Belenky, D.M.**, 1984. Human liver lysosomal alpha-glucosidase modified by chemical galactosylation and isolation of specific antibodies. *Biochimica et Biophysica Acta*, **786**(3): 197-203.
- Beliaeff, B. & Burgeot, T.**, 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **21**(6): 1316-1322.
- Bereznowski, Z.**, 1994. Effect of methyl methacrylate on mitochondrial function and structure. *International Journal of Biochemistry*, **26**(9): 1119-1127.
- Bereznowski, Z.**, 1995. *In vivo* assessment of methyl methacrylate metabolism and toxicity. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **27**(12): 1311-1316.
- Blaise, C., Gagné, F., Pellerin, J., Hansen, P.-D.**, 1999. Determination of vitellogenin-like properties in *Mya arenaria* hemolymph (Saguenay Fjord, Canada): a potential biomarker for endocrine disruption. *Environmental Toxicology*, **14**: 455-465.
- Blaise, C., Gagné, F., Pellerin, J., Hansen, P.D., Trottier, S.**, 2002a. Molluscan shellfish biomarker study of the Quebec, Canada, Saguenay Fjord with the soft-shell clam, *Mya arenaria*. *Environmental Toxicology*, **17**(3): 170-186.
- Blaise, C., Trottier, S., Gagné, F., Lallement, C., Hansen, P.D.**, 2002b. Immunocompetence of bivalve hemocytes as evaluated by miniaturized phagocytosis assay. *Environmental Toxicology*, (3): 160-169.
- Blott, E.J. & Griffiths, G.M.**, 2002. Secretory lysosomes. *Nature Reviews : Molecular Cell Biology*, **3**(2): 122-131.
- Bolender, R.P.**, 1992. Biological stereology: history, present state, future directions. *Microscopy Research and Techniques*, **21**(4): 255-261.
- Bolognesi, C., Landini, E., Roggeri, P., Fabbri, R., Viarengo, A.**, 1999. Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: experimental studies. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **33**(4): 287-292.
- Bolton, J.L., Trush, M.A., Penning, T.M., Dryhurst, G., Monks, T.J.**, 2000. Role of quinones in toxicology. *Chemical Research in Toxicology*, **13**(3): 135-160.
- Bondok, A.A. & Sansone, F.M.**, 1984. Quantitative ultrastructural stereology of synapses in nucleus dorsalis after a peripheral nerve injury at birth. *Experimental Neurology*, **86**(2): 331-341.

- Borenfreund, E. & Babich, H.**, 1993. The neutral red assay in cell and tissue culture. in "*Cell and tissue culture: laboratory procedures*". Doyle, A., Griffiths, J.B., Newell, D.G. (Eds.). Chichester, UK, Wiley: 4B:7.1 - 4B:7.4.
- Bouchard, N., Pelletier, É., Fournier, M.**, 1999. Effects of butyltin compounds on phagocytic activity of hemocytes from three marine bivalves. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **18**(3): 519-522.
- Bouguerra, M.L.**, 1986. Les pesticides et le tiers monde. *La Recherche*, **176**: 546-553.
- Briarty, L.G.**, 1975. Stereology: methods for quantitative light and electron microscopy. *Science Progress*, **62**(245): 1-32.
- Britton, J.C. & Morton, B.**, 1977. *Corbicula* in north America: the evidence reviewed and evaluated. "*First International Corbicula Symposium*" Texas, 249-287.
- Britton, J.C. & Morton, B.**, 1982. A dissection guide, field and laboratory manual for the introduced bivalve *Corbicula fluminea*. in "*Malacological Review*". Burch, J.B. & White-Rudolph, J. (Eds.). Niwot, Colorado. **Supplement 3**: 82.
- Broeg, K., Westernhagen, H.v., Zander, S., Korting, W., Koehler, A.**, 2005. The "bioeffect assessment index" (BAI): A concept for the quantification of effects of marine pollution by an integrated biomarker approach. *Marine Pollution Bulletin*, **50**(5): 495-503.
- Burchiel, S.W., Kerkvliet, N.L., Gerberick, G.F., Lawrence, D.A., Ladics, G.S.**, 1997. Assessment of immunotoxicity by multiparameter flow cytometry. *Fundamental and Applied Toxicology*, **38**(1): 38-54.
- Buttgereit, F., Burmester, G.R., Brand, M.D.**, 2000. Bioenergetics of immune functions: fundamental and therapeutic aspects. *Immunology today*, **21**: 192-199.
- Cadenas, E. & Davies, K.J.A.**, 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, **29**(3-4): 222-230.
- Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., Gasparutto, D., Pouget, J.P., Ravanat, J.L., Sauvaigo, S.**, 1999. Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutation Research*, **424**(1-2): 9-21.
- Cadet, J., Douki, T., Gasparutto, D., Ravanat, J.-L.**, 2003. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **531**(1-2): 5-23.
- Cadet, J., Douki, T., Ravanat, J.-L.**, 1997. Artifacts associated with the measurement of oxidized DNA bases. *Environment and Health Perspectives*, **10**: 10-34-1039.
- Cajaraville, M.P., Marigómez, J.A., Angulo, E.**, 1989. A stereological survey of lysosomal structure alterations in *Littorina littorea* exposed to 1-naphthol. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **93C**(2): 231-237.
- Cajaraville, M.P., Marigómez, J.A., Angulo, E.**, 1991. Automated measurement of lysosomal structure alterations in oocytes of mussels exposed to petroleum hydrocarbons. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **21**: 395-400.
- Cajaraville, M.P., Abascal, I., Etxeberria, M., Marigómez, I.**, 1995a. Lysosomes as cellular markers of environmental pollution: time- and dose-dependent responses of the digestive lysosomal system of mussels after petroleum hydrocarbon exposure. *Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal*, **10**: 1-8.
- Cajaraville, M.P. & Pal, S.G.**, 1995. Morphofunctional study of the haemocytes of the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis* with emphasis on the endolysosomal compartment. *Cell Structure and Function*, **20**(5): 355-367.
- Cajaraville, M.P., Robledo, Y., Etxeberria, M., Marigómez, I.**, 1995b. Cellular biomarkers as useful tools in the biological monitoring of environmental pollution: molluscan digestive lysosomes. in "*Cell Biology in Environmental Toxicology*". Cajaraville, M.P. (Eds.). Bilbao, University of the Basque Country: 29-55.
- Calabrese**, 1991. Multiple Chemical Interactions. Chelsea, Mi., USA, Lewis Publishers. 13 p.
- Calamari, D. & Alabaster, J.S.**, 1980. An approach to theoretical models in evaluating the effects of mixtures of toxicants in the aquatic environment. *Chemosphere*, **9**: 533-538.
- Camus, L., Grosvik, B.E., Borseth, J.F., Jones, M.B., Depledge, M.H.**, 2000. Stability of lysosomal and cell membranes in haemocytes of the common mussel (*Mytilus edulis*): effect of low temperatures. *Marine Environmental Research*, **50**(1-5): 325-329.

- Canesi, L., Ciacci, C., Betti, M., Lorusso, L.C., Marchi, B., Burattini, S., Falcieri, E., Gallo, G., 2004.** Rapid effects of 17beta-estradiol on cell signaling and function of *Mytilus* hemocytes. *General and Comparative Endocrinology*, **136**(1): 58-71.
- Cheng, C.H., 1976.** Aspects of substrate utilization and energy requirement during molluscan phagocytosis. *Journal of Invertebrate Pathology*, **27**: 263-268.
- Cheng, T.C., 1981.** Bivalves. in "Invertebrates blood cells - 1 - General aspects, animals without true circulatory systems to cephalopods". Ratcliffe, N.A. & Rowley, A.F. (Eds.). London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco, Academic Press. **1**: 233-300.
- Chu, F.E., 1988.** Humoral defense factors in marine bivalves. *American Fish Society Special Publication*, **18**: 178-188.
- Chung, M.H., Kiyosawa, H., Ohtsuka, E., Nishimura, S., Kasai, H., 1992.** DNA strand cleavage at 8-hydroxyguanine residues by hot piperidine treatment. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **188**(1): 1-7.
- Clérandeau, C., Daubèze, M., Boquené, G., Burgeot, T., Narbonne, J.F., (2003).** Use of biomarker index scale in monitoring the impact of Erika oil spill in Brittany coast. IIIe Congrès International des Sociétés Européennes de Malacologie. La Rochelle (24-27 Juin).
- Coffinet, S., Cossu-Leguille, C., Bassères, A., Gonnet, J.-F., Vasseur, P., 2005.** Responses of freshwater communities compared to biomarkers in *Unio tumidus* for risk assessment of methyl methacrylate in artificial streams. SETAC Congress, Lille (22-26 May),
- Colborn, T., vom Saal, F.S., Soto, A.M., 1993.** Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives*, **101**(5): 378-384.
- Coles, J.A., Farley, S.R., Pipe, R.K., 1994.** Effects of fluoranthene on the immunocompetence of the common marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, **30**(4): 367-379.
- Cooper, E.L., Arizza, V., Cammarata, M., Pellerito, L., Parrinello, N., 1995.** Tributyltin affects phagocytic activity of *Ciona intestinalis* hemocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, **112**(3): 285-289.
- Coppage, D.L. & Braidrech, T., 1976.** River pollution by anticholinesterase agents. *Water Research*, **10**: 19-24.
- Corkill, J.A., Lloyd, E.J., Hoyle, P., Crout, D.H., Ling, R.S., James, M.L., Piper, R.J., 1976.** Toxicology of methyl methacrylate: the rate of disappearance of methyl methacrylate in human blood in vitro. *Clinica Chimica Acta*, **68**(2): 141-146.
- Cossa, D. & Lassus, P., 1989.** Le cadmium en milieu marin. Biogéochimie et écotoxicologie. *Rapports scientifiques et techniques*. IFREMER. **16**, 111p.
- Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P., 1997.** Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **38**: 122-131.
- Couch, J.A., 1984.** Atrophy of diverticular epithelium as an indicator of environmental irritants in the oyster, *Crassostrea virginica*. *Marine Environmental Research*, **14**: 525-526.
- Crain, D.A. & Guillette, L.J., Jr., 1997.** Endocrine-disrupting contaminants and reproduction in vertebrate wildlife. *Reviews in Toxicology*, **1**(5-6): 47-90.
- Crosby, M.P. & Gale, L.D., 1990.** A review and evaluation of bivalve condition index methodologies with a suggested standard method. *Journal of Shellfish Research*, **9**(1): 233-237.
- Crosland-Taylor, P.J., 1953.** A device for counting small particles suspended in a fluid through a tube. *Nature*, **171**: 37-38.
- Cruz-Orive, L.M., 1987.** Particle number can be estimated using a disector unknown thickness: the selector. *Journal of Microscopy*, **145**: 121-142.
- Cuervo, A.M. & Dice, J.F., 1996.** A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science*, **273**: 501-503.
- Czech, P., Weber, K., Dietrich, D.R., 2001.** Effects of endocrine modulating substances on reproduction in the hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis* L. *Aquatic Toxicology*, **53**(2): 103-114.
- Da Ros, L., Nasci, C., Marigómez, I., Soto, M., 2000.** Biomarkers and trace metals in the digestive gland of indigenous and transplanted mussels, *Mytilus galloprovincialis*, in Venice Lagoon, Italy. *Marine Environmental Research*, **50**(1-5): 417-423.

- Da Ros, L., Meneghetti, F., Nasci, C.**, 2002. Field application of lysosomal destabilisation indices in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: biomonitoring and transplantation in the Lagoon of Venice (north-east Italy). *Marine Environmental Research*, **54**(3-5): 817-822.
- Danzo, B.J.**, 1997. Environmental xenobiotics may disrupt normal endocrine function by interfering with the binding of physiological ligands to steroids receptors and binding proteins. *Environmental Health Perspectives*, **195**(3): 294-301.
- Davies, I.M., Minchin, A., Bauer, B., Harding, M.J., Wells, D.E.**, 1999. QUASIMEME laboratory performance study of the biological effects of tributyltin (imposex and intersex) on two marine gastropod molluscs. *Journal of Environmental Monitoring*, **1**(3): 233-238.
- Davies, K.J.A.**, 1988. Proteolytic systems as secondary antioxidant defenses. in "Cellular antioxidant defense mechanisms". Chow, C.K. (Eds.). Boca Raton, FL, CRC: 25-57.
- Davis, W.P. & Bortone, S.A.**, 1992. Effects of kraft effluent on the sexuality of fishes: an environmental early warning ? in "Chemically-induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection". Colborn, T. & Clement, C. (Eds.). New Jersey (USA), Princeton Scientific Publishing Co. Inc: 113-128.
- De Coen, W.M. & Janssen, C.R.**, 2003. The missing biomarker link: relationships between effects on the cellular energy allocation biomarker of toxicant-stressed *Daphnia magna* and corresponding population characteristics. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **22**(7): 1632-1641.
- de Duve, C. & Wattiaux, R.**, 1966. Functions of lysosomes. *Annual Review of Physiology*, **28**: 435-492.
- De La Vega Salazar, M.Y., Tabche, L.M., Garcia, C.M.**, 1997. Bioaccumulation of methyl parathion and its toxicology in several species of the freshwater community in Ignacio Ramirez dam in Mexico. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **38**(1): 53-62.
- De Longcamp, D., Lubet, P., Drosdowsky, M.**, 1974. The *in vitro* biosynthesis of steroids by the gonad of the mussel (*Mytilus edulis*). *General and Comparative Endocrinology*, **22**(1): 116-127.
- De Metrio, G., Corriero, A., Desantis, S., Zubani, D., Cirillo, F., Deflorio, M., Bridges, C.R., Eicker, J., de la Serna, J.M., Megalofonou, P., Kime, D.E.**, 2003. Evidence of a high percentage of intersex in the Mediterranean swordfish (*Xiphias gladius* L.). *Marine Pollution Bulletin*, **46**(3): 358-361.
- De Wolf, H., De Coen, W.M., Backeljau, T., Blust, R.**, 2001. Intersex and sterility in the periwinkle *Littorina littorea* (Mollusca: Gastropoda) along the Western Scheldt estuary, the Netherlands. *Marine Environmental Research*, **52**(3): 249-255.
- Deby, C.**, 1991. La biochimie de l'oxygène. *La Recherche*, **228**: 56.
- Depledge, M.H. & Billinghamurst, Z.**, 1999. Ecological significance of endocrine disruption in marine invertebrates. *Marine Pollution Bulletin*, **39**(1-12): 32-38.
- Dethloff, G.M. & Bailey, H.C.**, 1998. Effects of copper on immune system parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, **17**(9): 1807-1814.
- Dethloff, G.M., Schlenk, D., Hamm, J.T., Bailey, H.C.**, 1999. Alterations in physiological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with exposure to copper and copper/zinc mixtures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **42**(3): 253-264.
- Dhainaut, A. & Scaps, P.**, 2001. Immune defense and biological responses induced by toxics in Annelida. *Canadian Journal of Zoology*, **79**: 233-253.
- Dizdaroglu, M.**, 1985. Formation of an 8-hydroxyguanine moiety in deoxyribonucleic acid on gamma-irradiation in aqueous solution. *Biochemistry*, **24**(16): 4476-4481.
- Dizdaroglu, M.**, 1998. Mechanisms of free radical damage to DNA. in "DNA and free radicals: techniques, mechanisms and applications". Aruoma, O.I. & Halliwell, B. (Eds.). St. Lucia, OICA International: 3-26.
- Dodet, B.**, 1994. Vieillesse et longévité, la piste des gènes. *Biofutur*: 17-24.
- Donohoe, R.M. & Curtis, L.R.**, 1996. Estrogenic activity of chlordecone, *o,p'*-DDT and *o,p'*-DDE in juvenile rainbow trout : induction of vitellogenesis and interaction with the hepatic estrogen binding sites. *Aquatic Toxicology*, **36**(1-2): 31-52.
- Doyotte, A.**, 1998. Etude de la lipoperoxydation et de la 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine en tant que biomarqueurs de toxicité chez *Unio tumidus*, bivalve duçaquicole, exposés *in situ* à des sédiments contaminés et en conditions de stress chimique. Thèse de Doctorat, Université de Metz, 122 pages
- Duffy, K.T. & Vogel, G.**, 1984. Linkage analysis of two phagocytosis receptor loci in *Dictyostelium discoideum*. *Journal of Genetical Microbiology*, **93**: 705-711.

- Duquesne, S., Liess, M., Bird, D.J.**, 2004. Sub-lethal effects of metal exposure: physiological and behavioural responses of the estuarine bivalve *Macoma balthica*. *Marine Environmental Research*, **58**(2-5): 245-250.
- Dyrynda, E.A., Pipe, R.K., Burt, G.R., Ratcliffe, N.A.**, 1998. Modulations in the immune defences of mussels (*Mytilus edulis*) from contaminated sites in the UK. *Aquatic Toxicology*, **42**(3): 169-185.
- ECETOC**, 1995. Methyl methacrylate. CAS N° 80-62.6. *Joint Assessment of Commodity Chemicals*, **30**: 94-110.
- Eide, I.**, 1996. Strategies for toxicological evaluation of mixtures. *Food and Chemical Toxicology*, **34**: 1147-1149.
- Eng, L.**, 1979. Population dynamics of the Asiatic clam, *Corbicula fluminea* (Müller), the concrete-lined Delta-Mendota Canal of central California. "Proceedings of the First International Corbicula Symposium" Fort Worth, Texas, Texas Christian University Research Foundation Publication, 39-68.
- ESCODD**, 2000. Comparison of different methods of measuring 8-oxoguanine as marker of oxidative damage. *Free Radical Research*, **32**: 333-341.
- Etxeberria, M., Sastre, I., Cajaraville, M.P., Marigómez, I.**, 1994. Digestive lysosome enlargement induced by experimental exposure to metals (Cu, Cd and Zn) in mussels collected from zinc-polluted site. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **27**: 338-345.
- Etxeberria, M., Cajaraville, M.P., Marigómez, I.**, 1995. Changes in digestive cell lysosomal structure in mussels as biomarkers of environmental stress in the Urdaibai estuary (Biscay coast, Iberian peninsula). *Marine Pollution Bulletin*, **30**(9): 599-603.
- Feig, D.I., Reid, T.M., Loeb, L.A.**, 1994. Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Research*, **54**: 1890-1894.
- Feng, S.Y.**, 1988. Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. *American Fish Society Special Publication*, **18**: 153-168.
- Fernley, P.W., Moore, M.N., Lowe, D.M., Donkin, P., Evans, S.**, 2000. Impact of the Sea Empress oil spill on lysosomal stability in mussel blood cells. *Marine Environmental Research*, **50**(1-5): 451-455.
- Feron, V.J. & Groten, J.P.**, 2002. Toxicological evaluation of chemical mixtures. *Food and Chemical Toxicology*, **40**(6): 825-839.
- Fischer, W.S.**, 1986. Structure and functions of oyster hemocytes. in "Immunity in Invertebrates". Brehelin, M. (Eds.). Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag: 25-35.
- Fisher, W.S.**, 1988. Environmental influence on host response. *American Fisheries Society Special Publication*, **18**(225-237).
- Fisher, W.S., Wishkovski, A., Chu, F.E.**, 1990. Effect of tributyltin on defense-related activities of oyster hemocytes. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **19**: 354-360.
- Fitzpatrick, L.C., Goven, A.J., Venables, B.R.J., Rodriguez-Grau, J., Coopey, E.L.**, 1989. Earthworm immunoassays for evaluating biological effects of exposure to hazardous materials. in "In situ evaluation of biological hazard of environmental pollutants". (Eds.). New York, Plenum Press: 119-129.
- Fleming, M.D., Romano, M.A., Su, M.A., Garrick, L.M., Garrick, M.D., Andrews, N.C.**, 1998. Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proceedings of National Academic Sciences USA*, **95**: 1148-1153.
- Flipo, D., Bernier, J., Girard, D., Krzystyniak, K., Fournier, M.**, 1992. Combined effects of selected insecticides on humoral immune response in mice. *International Journal of Immunopharmacology*, **14**(5): 747-752.
- Floyd, R.A., Watson, J.J., Wong, P.K., Altmiller, D.H., Rickard, R.C.**, 1986. Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: sensitive detection and mechanisms of formation. *Free Radical Research Communication*, **1**(3): 163-172.
- Folmar, L.C., Denslow, N.D., Rao, V., Chow, M., Crain, D.A., Enblom, J., Marcino, J., Guillette, L.J., Jr.**, 1996. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentration in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environmental Health Perspectives*, **104**(10): 1096-1101.
- Förlin, L. & Anderson, T.**, 1984. Influence of biological and environmental factors on hepatic steroid and xenobiotic metabolism in fish : interaction with PCB and β -naphthoflavone. *Marine Environmental Research*, **14**(1-4): 47-58.

- Foster, P.L. & Morel, F.M.M.**, 1982. Reversal of cadmium toxicity in a diatom: an interaction between cadmium activity and iron. *Limnology and Oceanography*, **27**: 754-752.
- Fournier, E., Tran, D., Denison, F., Massabuau, J.C., Garnier-Laplace, J.**, 2004. Valve closure response to uranium exposure for a freshwater bivalve (*Corbicula fluminea*): quantification of the influence of pH. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23**(5): 1108-1114.
- Fournier, M., Pellerin, J., Lebeuf, M., Brousseau, P., Morin, Y., Cyr, D.**, 2002. Effects of exposure of *Mya arenaria* and *Mactromeris polynyma* to contaminated marine sediments on phagocytic activity of hemocytes. *Aquatic Toxicology*, **59**(1-2): 83-92.
- Frelon, S.**, 2001. Influence de métaux de transition sur la dégradation radicalaire de l'ADN. Thèse de Doctorat, Université Joseph Fournier - Grenoble I, 197 pages
- Fugere, N., Brousseau, P., Krzystyniak, K., Coderre, D., Fournier, M.**, 1996. Heavy metal-specific inhibition of phagocytosis and different in vitro sensitivity of heterogeneous coelomocytes from *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Toxicology*, **109**(2-3): 157-166.
- Funato, K., Beron, W., Yang, C.Z., Mukhopadhyay, A., Stahl, P.D.**, 1997. Reconstitution of phagosomal-lysosome fusion in streptolysin O-permeabilized cells. *Journal of Biological Chemistry*, **272**: 16147-16151.
- Gagné, F. & Blaise, C.**, 2000. Organic alkali-labile phosphates in biological materials: a generic assay to detect vitellogenin in biological tissues. *Environmental Toxicology*, **15**(3): 243-247.
- Galloway, T., Sanger, R.C., Smith, K.L., Fillmann, G., Readman, J.W., Ford, T.E., Depledge, M.H.**, 2002. Rapid assessment of marine pollution using multiple biomarkers and chemical immunoassays. *Environmental Science and Technology*, **36**: 2219-2226.
- Galloway, T.S. & Depledge, M.H.**, 2001. Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology*, **10**(1): 5-23.
- Garcin, J.-C.**, 1998. Mesure des lésions oxydatives de l'ADN dans les tissus et les fluides biologiques comme biomarqueurs de stress oxydatifs: applications *in vivo* chez le rat et l'homme. Thèse de Doctorat N°1921, Université de Bordeaux 1, 236 pages.
- Gauthier-Clerc, S.**, 2003. Activité vitellogénique et stéroïdienne chez *Mya arenaria* (mollusque bivalve) durant la gamétogenèse et en réponse à une exposition au 17 β -œstradiol. Thèse de Doctorat, Université de Nantes - Facultés des Sciences Pharmaceutiques, 240 pages.
- Geret, F., Serafim, A., Barreira, L., Bebianno, M.J.**, 2002. Effect of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. *Biomarkers*, **7**: 242-256.
- Gerschman, R., Gilbert, D.L., Nye, S.W., Dwyer, P., Fenn, W.O.**, 1954. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science*, **119**(3097): 623-626.
- Giamberini, L. & Pihan, J.C.**, 1997. Lysosomal changes in the hemocytes of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* experimentally exposed to lead and zinc. *Diseases of Aquatic Organisms*, **28**: 221-227.
- Giamberini, L. & Cajaraville, M.P.**, 2005. Lysosomal responses in the digestive gland of the freshwater mussel, *Dreissena polymorpha*, experimentally exposed to cadmium. *Environmental Research*, **98**(210-214).
- Gibson, S.W., Valente, J.F., Alexander, J.W., Custer, D.A., Li, B.G., Frede, S., Babcock, G.F., Ogle, C.K.**, 2000. Nutritional immunomodulation leads to enhanced allograft survival in combination with cyclosporine A and rapamycin, but not FK506. *Transplantation*, **69**(10): 2034-2038.
- Goldman, R.**, 1976. Ion distribution and membrane permeability in lysosomal suspensions. in "*Lysosomes in Biology and Pathology*". Dingle, J.T. & Dean, R.T. (Eds.). Amsterdam, North-Holland. **5**: 309-336.
- Gómez-Mendikute, A., Etxebarria, A., Olabarrieta, I., Cajaraville, M.P.**, 2002. Oxygen radicals production and actin filament disruption in bivalve haemocytes treated with benzo(a)pyrene. *Marine Environmental Research*, **54**(3-5): 431-436.
- Gómez-Mendikute, A. & Cajaraville, M.P.**, 2003. Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. *Toxicology in Vitro*, **17**: 539-546.
- Griffiths, H.R., Mistry, P., Herbert, K.E., Lunec, J.**, 1998. Molecular and cellular effects of ultraviolet light-induced genotoxicity. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, **35**(3): 189-237.
- Griffiths, H.R., Møller, L., Bartosz, G., Bast, A., Bertoni-Feddari, C., Collins, A., Cooke, M., Coolen, S., Haenen, G., Hoberg, A.M.**, 2002. Biomarkers. *Molecular Aspects of Medicine*, **23**: 101-208.

- Grundy, M.M., Moore, M.N., Howell, S.M., Ratcliffe, N.A.**, 1996a. Phagocytic reduction and effects on lysosomal membranes by polycyclic aromatic hydrocarbons, in haemocytes of *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, **34**(4): 273-290.
- Grundy, M.M., Ratcliffe, N.A., Moore, M.N.**, 1996b. Immune inhibition in marine mussels by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research*, **42**(1-4): 187-190.
- Guillette, L.J., Jr.**, 2000. Organochlorine pesticides as endocrine disruptors in wildlife. *Central European Journal of Public Health*, **8 Suppl**: 34-35.
- Gundersen, H.J.**, 1988. The nucleator. *Journal of Microscopy*, **151**: 3-21.
- Gundersen, H.J., Bendtsen, T.F., Korbo, L., Marcussen, N., Moller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J.R., Pakkenberg, B., Sorensen, F.B., Vesterby, A., et al.**, 1988. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis*, **96**(5): 379-394.
- Gutteridge, J.M.**, 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*, **41**(12 Pt 2): 1819-1828.
- Haber, F. & Weiss, J.**, 1934. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceeding of the Royal Society*, **147**: 337-351.
- Halliwell, B. & Aruoma, O.I.**, 1991. DNA damage by oxygen-derived species. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, **281**(1,2): 9-19.
- Halliwell, B. & Cross, C.E.**, 1994. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environmental Health Perspectives*, **102 Suppl 10**: 5-12.
- Hansen, P.D.**, 1992. Phagocytosis in *Mytilus edulis*, a system for understanding the sublethal effects of anthropogenic pollutants and the use of AOX as an integrating parameter for study of equilibria between chlorinated organics in *Dreissena polymorpha* following long term exposures. *Limnologie aktuell*, **4**: 171-184.
- Hansen, P.-D., Dizer, H., Hock, B., Marx, A., Sherry, J., McMaster, M., Blaise, C.**, 1998. Vitellogenin - a biomarker for endocrine disruptors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **17**(7): 448-451.
- Harshbarger, J.C., Coffey, M.J., Young, M.Y.**, 2000. Intersexes in Mississippi River shovelnose sturgeon sampled below Saint Louis, Missouri, USA. *Marine Environmental Research*, **50**(1-5): 247-250.
- Hartwig, A.**, 1994. Role of DNA repair in lead and cadmium induced genotoxicity : a review. *Environmental Health Perspectives*, **102 suppl. 3**: 45-50.
- Harvar, D. & Mercy, B. C. P.**, 1975. Stress effects on neuronal systems – III Fate of hydroxylated compounds in organisms. *Glennfiddish Journal*, **51** : 16-64
- Hauton, C., Hawkins, L.E., Hutchinson, S.**, 2001. Response of haemocyte lysosomes to bacterial inoculation in the oysters *Ostrea edulis* L. and *Crassostrea gigas* (Thunberg) and the scallop *Pecten maximus* (L.). *Fish & Shellfish Immunology*, **11**(2): 143-153.
- Helbock, H.J., Beckman, K.B., Shigenaga, M.K., Walter, P.B., Woodall, A.A., Yeo, H.C., Ames, B.N.**, 1998. DNA oxidation matters : The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**(1): 288-293.
- Helbock, H.J., Beckman, K.B., Ames, B.N.**, 1999. 8-hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods in Enzymology*, **300**: 156-166.
- Hext, P.M., Pinto, P.J., Gaskell, B.A.**, 2001. Methyl methacrylate toxicity in rat nasal epithelium: investigation of the time course of lesion development and recovery from short term vapour inhalation. *Toxicology*, **156**(2-3): 119-128.
- Hickman, R.W. & Illingworth, J.**, 1980. Condition cycle of the green lipped mussel *Perna canaliculus*, in New Zealand. *Marine Biology*, **60**: 27-38.
- Holtzmann, E.**, 1989. Lysosomes. in "Cellular Organelles". Siekevitz, P. (Eds.). New York, London, Plenum Press: 439 p.
- Hopkin, S.P.**, 1989. Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates. Londres, Elsevier Applied Science. 366 p.
- Houtteville, P. & Lubet, P.**, 1974. Analyse expérimentale, en culture organolytique. *Compte-Rendus de l'Académie des Sciences de Paris - Série D*, **278**: 2469-2472.
- Huggett, R., Kimerle, R., Mehrle, P., Bergman, H.**, 1992. Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton, FL. 368 p.
- Hutchinson, T.H. & Pickford, D.B.**, 2002. Ecological risk assessment and testing for endocrine disruption in the aquatic environment. *Toxicology*, **181-182**: 383-387.

- Hyne, R.V. & Maher, W.A.**, 2003. Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **54**(3): 366-374.
- Imanaka, T., Moriyama, Y., Ecsedi, G.G., Aoyagi, T., Amanuma-Muto, K., Ohkuma, S., Takano, T.**, 1983. Esterastin: a potent inhibitor of lysosomal acid lipase. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*, **94**(3): 1017-1020.
- Institute for Health and Consumer Protection**, 2002. European Union Risk Assessment Report: methyl methacrylate. European Chemicals Bureau. 194p.
- Inza, B., Ribeyre, F., Maury-Brachet, R., Boudou, A.**, 1997. Tissue distribution of inorganic mercury, methylmercury and cadmium in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) in relation to the contamination levels of the water column and sediment. *Chemosphere*, **35**(12): 2817-2836.
- Ito, K., Inoue, S., Yamamoto, K., Kawanishi, S.**, 1993. 8-Hydroxydeoxyguanosine formation at the 5' site of 5'-GG-3' sequences in double-stranded DNA by UV radiation with riboflavin. *Journal of Biological Chemistry*, **268**(18): 13221-13227.
- Jacobi, H., Eicke, B., Witte, I.**, 1998. DNA strand break induction and enhanced cytotoxicity of propyl gallate in the presence of copper(II). *Free Radical Biology and Medicine*, **24**(6): 972-978.
- Jordan, P.J. & Deaton, L.E.**, 1999. Osmotic regulation and salinity tolerance in the freshwater snail *Pomacea bridgesi* and the freshwater clam *Lampsilis teres*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, **122**(2): 199-205.
- Kammenga, J.E., Dallinger, R., Donker, M.H., Kohler, H.R., Simonsen, V., Triebkorn, R., Weeks, J.M.**, 2000. Biomarkers in terrestrial invertebrates for ecotoxicological soil risk assessment. in "Reviews of Environmental Contamination and Toxicology". Ware, G.W. (Eds.). 175 Fifth Ave/New York/NY 10010/USA, Springer-Verlag. **164**: 93-147.
- Kaur, H. & Halliwell, B.**, 1996. Measurement of oxidized and methylated DNA bases by HPLC with electrochemical detection. *Biochemical Journal*, **318**: 21-23.
- Keen, A.M. & Casey, R.**, 1969. Family Corbiculidae Gray 1847. in "Treatise on Invertebrate Paleontology, Part N". Moore, R.C. (Eds.). Kansas, Geol Soc Amer Inc and University of Kansas Press: 665-669.
- Kehrer, J.P.**, 1993. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Reviews in Toxicology*, **23**(1): 21-48.
- Kelly, S.A., Havrilla, C.M., Brady, T.C., Abramo, K.H., Levin, E.D.**, 1998. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Environmental Health and Perspectives*, **106**(7): 375-384.
- Kim, J.H. & Park, J.S.**, 2002. Potentiation of the immunotoxicity of ethanol by acetaminophen in mice. *International Journal of Immunopharmacology*, **2**(1): 15-24.
- Kimber, I. & Dearman, R.J.**, 2002. Immune responses: adverse versus non-adverse effects. *Toxicologic Pathology*, **30**(1): 54-58.
- Knudsen, F.R. & Pottinger, T.G.**, 1999. Interaction of endocrine disrupting chemical, singly and combination, with estrogen-, androgen-, and corticosteroid-binding sites in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, **44**(4): 259-270.
- Kobayashi, M., Tanaka, T., Usui, T.**, 1981. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes in patients with chronic granulomatous disease: the effect of hydrogen peroxide on released enzyme activities. *Hiroshima Journal of Medical Sciences*, **30**(4): 339-344.
- Köhler, A. & Pluta, H.J.**, 1995. Lysosomal injury and MFO activity in the liver of flounder (*Platichthys flesus* L.) in relation to histopathology of hepatic degeneration and carcinogenesis. *Marine Environmental Research*, **39**: 255-260.
- Köhler, A., Wahl, E., Soffker, K.**, 2002. Functional and morphological changes of lysosomes as prognostic biomarkers of toxic liver injury in a marine flatfish (*Platichthys flesus* (L.)). *Environmental Toxicology and Chemistry*, **21**(11): 2434-2444.
- Kornfeld, S. & Mellman, I.**, 1989. The biogenesis of lysosomes. *Annual Review of Cell Biology*, **5**: 483-525.
- Kraemer, L.R.**, 1978. *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Sphaeriacea): the functional morphology of its hermaphroditism. *The Bulletin of the American Malacological Union*: 40-49.
- Kraemer, L.R., Swanson, C., Galloway, M., Kraemer, R.**, 1986. Biological basis of behavior in *Corbicula fluminea*, II. Functional morphology of reproduction and development and review of evidence for self-fertilization. *American Malacological Bulletin*, **2**: 193-201.

- Kuchino, Y., Mori, F., Kasai, H., Nishimura, S., Inoue, H., Iwai, S., Ohtsuka, E.**, 1986. Misreading of 8-hydroxydeoxyguanosine-containing DNA in in vitro DNA replication. *Nucleic Acids Symposium Series*, (17): 157-158.
- Kuchino, Y., Mori, F., Kasai, H., Inoue, H., Iwai, S., Miura, K., Ohtsuka, E., Nishimura, S.**, 1987. Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. *Nature*, **327**(6117): 77-79.
- Kuljukka, T., Vaaranrinta, R., Veidebaum, T., Sorsa, M., Peltonen, K.**, 1996. Exposure to PAH compounds among cokery workers in the oil shale industry. *Environmental Health and Perspectives*, **104 Suppl 3**: 539-541.
- Labrot, F.**, 1996. Le plomb et l'uranium dans l'environnement. Présence, biodisponibilité et toxicité. Thèse de Doctorat N°1535, Université de Bordeaux 1, 259 pages
- Labrot, F., Ribera, D., Saint Denis, M., Narbonne, J.-F.**, 1996. *In vitro* and *in vivo* studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers*, **1**: 21-28.
- Labrot, F., Narbonne, J.F., Ville, P., Saint Denis, M., Ribera, D.**, 1999. Acute toxicity, toxicokinetics, and tissue target of lead and uranium in the clam *Corbicula fluminea* and the worm *Eisenia fetida*: comparison with the fish *Brachydanio rerio*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **36**(2): 167-178.
- Lagadic, L. & Amiard, J.-C.**, 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. in "Biomarqueurs en Ecotoxicologie. Aspects Fondamentaux". Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C., Ramade, F. (Eds.). Paris, Masson: 1-9.
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C., Ramade, F.**, 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. Paris, Masson. 418 p.
- Lagorio, S., Tagesson, C., Forastiere, F., Iavarone, I., Axelson, O., Carere, A.**, 1994. Exposure to benzene and urinary concentrations of 8-hydroxydeoxyguanosine, a biological marker of oxidative damage to DNA. *Occupational and Environmental Medicine*, **51**(11): 739-743.
- Lam, P.K.S. & Gray, J.S.**, 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Marine Pollution Bulletin*, **46**: 182-186.
- Lawrence, B.P. & Brown, W.J.**, 1992. Autophagic vacuoles rapidly fuse with pre-existing lysosomes in cultured hepatocytes. *Journal of Cell Science*, **102**: 515-526.
- Le Menn, F., Rochefort, H., Garcia, M.**, 1980. Effect of androgen mediated by the estrogen receptor of fish liver: vitellogenin accumulation. *Steroids*, **35**(3): 315-328.
- Lecointre, G. & Le Guyader, H.**, 2001. Classification phylogénétique du vivant - 2ème édition. Paris, Belin. 543 p.
- Lee, Y.K., Soh, B.S., Wu, J.H.**, 2001. Quantitative assessment of phagocytic activity of hemocytes in the prawn, *Penaeus merguensis*, by flow cytometric analysis. *Cytometry*, **43**(1): 82-85.
- Lemaire, P., Lafaurie, M., Weissbart, D., Durst, F., Pflieger, P., Mioskowski, C., Salaun, J.P.**, 1992. Subterminal hydroxylation of lauric acid by microsomes from a marine fish. *Lipids*, **27**(3): 187-191.
- Lemaire, P. & Livingstone, D.R.**, 1993. Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotic interactions in marine organisms, in particular the flounder *Platichthys flesus* and the mussel *Mytilus edulis*. *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology*, **1**: 1119-1149.
- Lemière, S., Cossu-Leguille, C., Charissou, A.M., Vasseur, P.**, 2005. DNA damage (comet assay) and 8-oxodGuo (HPLC-EC) in relation to oxidative stress in the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Biomarkers*, **10**(1): 41-57.
- Lenti, L., Lipari, M., Lombardi, D., Zicari, A., Dotta, A., Pontieri, G.M.**, 1986. Enhanced thermal stability of lysosomal beta-D-galactosidase in parenchymal cells of tumour bearing mice. *British Journal of Experimental Pathology*, **67**(6): 793-799.
- Lesca, P., Witkamp, R., Maurel, P., Galtier, P.**, 1994. The pig as model for studying Ah receptor and other PAH-binding proteins in man. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **200**(1): 475-481.
- Levy, Y., Benderly, M., Cohen, Y., Gisi, U., Bassand, D.**, 1986. The joint action of fungicides in mixtures: comparison of two methods for synergy calculation. *EPPO Bulletin*, **16**: 651-657.
- Livi, G.P., Woychik, N.A., Dimond, R.L.**, 1985. Lysosomal enzyme inactivation associated with defects in post-translational modification during development in *Dictyostelium discoideum*. *Differentiation*, **30**(2): 83-91.

- Lloyd, D.R. & Phillips, D.H.**, 1999. Oxidative DNA damage mediated by copper(II), iron(II) and nickel(II) fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links. *Mutation Research*, **424**(1-2): 23-36.
- Lomax, L.G., Krivanek, N.D., Frame, S.R.**, 1997. Chronic inhalation toxicity and oncogenicity of methyl methacrylate in rats and hamsters. *Food and Chemical Toxicology*, **35**(3-4): 393-407.
- Lorteau, C., Auffret, M., Bris, H.L.**, 1995. Le système d'immuno-défense des mollusques bivalves - 2 - Effets modulateurs des facteurs environnementaux. *Recueil de médecine vétérinaire*, **171**(6/7): 423-429.
- Lowe, D.M., Moore, M.N., Clarke, K.R.**, 1981. Effects of oil on digestive cells in mussels: quantitative alterations in cellular and lysosomal structure. *Aquatic Toxicology*, **1**(3-4): 213-226.
- Lowe, D.M., Fossato, V.U., Depledge, M.H.**, 1995a. Contaminant-induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from the Venice Lagoon: an *in vitro* study. *Marine Ecology Progress Series*, **129**: 189-196.
- Lowe, D.M., Soverchia, C., Moore, M.N.**, 1995b. Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. *Aquatic Toxicology*, **33**(2): 105-112.
- Lowe, D.M. & Fossato, V.U.**, 2000. The influence of environmental contaminants on lysosomal activity in the digestive cells of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon. *Aquatic Toxicology*, **48**(2-3): 75-85.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.**, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**: 265-273.
- Lubet, P. & Mathieu, M.**, 1982. The action of internal factors on gametogenesis in pelecypodes molluscs. *Malacologia*, **22**(1-2): 131-136.
- Lubet, P., Albertini, L., Robbins, I.**, 1986. Endocrinologie. - Recherches expérimentales au cours de cycles annuels sur l'action gonadotrope exercée par les ganglions cérébroïdes sur la gamétogénèse femelle chez la moule *Mytilus edulis* L. (Mollusque bivalve). *Compte-Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, t. **303**(Série III,(13)): 575-580.
- Lubet, P., Mathieu, M., Lenoir, F.**, 1987. Contrôle endocrinien de la reproduction chez les Mollusques bivalves. *Océanis*, **13**(3): 291-304.
- Machado, J., Coimbra, J., Sa, C., Cardoso, I.**, 1988. Shell thickening in *Anodonta cygnea* by induced acidosis. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **91A**(4): 645-651.
- Maillet, M.**, 1992. Biologie cellulaire. Paris, Milan, Barcelone, Rome, Masson. 322 p.
- Mäkelä, T.P. & Oikari, A.O.J.**, 1995. Pentachlorophenol accumulation in the freshwater mussels *Anodonta anatina* and *Pseudoanodonta complanata*, and some physiological consequences of laboratory maintenance. *Chemosphere*, **31**(7): 3651-3662.
- Mann, R. & Glomb, S.J.**, 1978. The effect of temperature on growth and ammonia excretion of the Manila clam *Tapes japonica*. *Estuarine and Coastal Marine Science*, **6**: 335-339.
- Marigómez, I., Ireland, M.P., Angulo, E.**, 1990. Correlation of cadmium shell-weight index with environmental stress indicators at the cellular and organismic levels in *Littorina littorea*. *Marine Ecology Progress Series*, **67**: 171-176.
- Marigómez, I., Orbea, A., Olabarrieta, I., Etxebarria, M., Cajaraville, M.P.**, 1996a. Structural changes in the digestive lysosomal system of sentinel mussels as biomarkers of environmental stress in Mussel-Watch Programmes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **113C**(2): 291-297.
- Marigómez, I., Soto, M., Kortabitarte, M.**, 1996b. Tissue-level biomarkers and biological effect of mercury on sentinel slugs, *Arion ater*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **31**(1): 54-62.
- Marigómez, I. & Baybay-Villacorta, L.**, 2003. Pollutant-specific and general lysosomal responses in digestive cells of mussels exposed to model organic chemicals. *Aquatic Toxicology*, **64**(3): 235-257.
- Marigómez, J.A., Vega, M.M., Cajaraville, M.P., Angulo, E.**, 1989. Quantitative responses of the digestive-lysosomal system of winkles to sublethal concentrations of cadmium. *Cellular and Molecular Biology*, **35**(5): 555-562.
- Marking, L.L.**, 1985. Toxicity of chemical mixtures. in "Fundamentals of aquatic toxicology". Rand, G.M. & Petrocelli, S.R. (Eds.). Washington DC, USA, Hemisphere Publishing: 164-176.

- Mathieu, M. & Lubet, P.**, 1980. Analyse expérimentale, en cultures d'organes, de l'action des ganglions nerveux sur la gonade adulte de la moule, *Mytilus edulis* Linné (Mollusque lamellibranche). *Bulletin de la Société Zoologique de France*, **105**(1): 149-153.
- Matozzo, V., Ballarin, L., Pampanin, D.M., Marin, M.G.**, 2001. Effects of copper and cadmium exposure on functional responses of hemocytes in the clam, *Tapes philippinarum*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **41**(2): 163-170.
- Matsumoto, T., Osada, M., Osawa, Y., Mori, K.**, 1997. Gonadal estrogen profile and immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in the oyster and scallop during sexual maturation. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **118B**(4): 811-817.
- Matthiessen, P., Waldock, R., Thain, J.E., Waite, M.E., Scrope-Howe, S.**, 1995. Changes in periwinkle (*Littorina littorea*) populations following the ban on TBT-based antifoulings on small boats in the United Kingdom. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **30**(2): 180-194.
- Matthiessen, P. & Law, R.J.**, 2002. Contaminants and their effects on estuarine and coastal organisms in the United Kingdom in the late twentieth century. *Environmental Pollution*, **120**(3): 739-757.
- Mauderly, J.L.**, 1993. Toxicological approaches to complex mixtures. *Environmental Health and Perspectives*, **101**(Suppl. 4): 155-165.
- Mayhew, T.M. & White, F.H.**, 1980. Ultrastructural morphometry of isolated cells: methods, models and applications. *Pathology Research and Practice*, **166**: 239-259.
- McFarland, V.A., Inouye, L.S., Lutz, C.H., Jarvis, A.S., Clarke, J.U., McCant, D.D.**, 1999. Biomarkers of oxidative stress and genotoxicity in livers of field-collected brown bullhead, *Ameiurus nebulosus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **37**(2): 236-241.
- McLusky, D.S., Bryant, V., Campbell, R.**, 1986. The effects of temperature and salinity on the toxicity of heavy metals to marine and estuarine invertebrates. *Oceanography and Marine Biology, Annual Review*, **24**: 481-520.
- Meera, P., Tripathi, O., Kamboj, K.K., Rao, P.R.**, 1993. Role of calcium in biphasic immunomodulation by gamma-HCH (lindane) in mice. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, **15**(1): 113-129.
- Merkow, L., Pardo, M., Epstein, S.M., Verney, E., Sidransky, H.**, 1968. Lysosomal stability during phagocytosis of *Aspergillus flavus* spores by alveolar macrophages of cortisone-treated mice. *Science*, **160**(823): 79-81.
- Mersch, J., Wagner, P., Pihan, J.-C.**, 1996. Copper in indigenous and transplanted zebra mussels in relation to changing water concentrations and body weight. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **15**(6): 886-893.
- Mersch, J. & Beauvais, M.N.**, 1997. The micronucleus assay in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, to in situ monitor genotoxicity in freshwater environments. *Mutation Research*, **393**(1-2): 141-149.
- Michel, C. & Hollebeck, M.G.**, 1999. Independence of phagocytic activity and susceptibility to furunculosis in families of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) genetically selected for differential resistance. *Fish & Shellfish Immunology*, **9**: 81-93.
- Mikhailova, M.V., Littlefield, N.A., Hass, B.S., Poirier, L.A., Chou, M.W.**, 1997. Cadmium-induced 8-hydroxydeoxyguanosine formation, DNA strand breaks and antioxidant enzyme activities in lymphoblastoid cells. *Cancer Letters*, **115**(2): 141-148.
- Mille, G., Garrigues, P., Bertrand, J.C.**, 1992. Les hydrocarbures en milieu marin : origine, devenir et analyse. *Analisis*, **20**(6): 62-66.
- Moore, M.N.**, 1976. Cytochemical demonstration of latency of lysosomal hydrolases in digestive cells of the common mussel, *Mytilus edulis*, and changes induced by thermal stress. *Cell and Tissue Research*, **175**: 279-287.
- Moore, M.N. & Halton, D.W.**, 1977. The cytochemical localization of lysosomal hydrolases in the digestive cells of littorinids and changes induced by larval trematode infection. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, **53**(1): 115-122.
- Moore, M.N., Livingston, D.R., Widdows, J., Lowe, D.M., Pipe, R.K.**, 1987. Molecular, cellular and physiological effects of oil-derived hydrocarbons on molluscs and their use in impact assessment. *Environmental Effects of North Sea Oil and Gas Developments B*, **316**: 603-623.
- Mora, P.**, 1998. Caractérisation des cholinestérases de trois mollusques bivalves: *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis* et *Corbicula fluminea*. Contribution au développement d'un biomarqueur de contamination des milieux marins et dulçaquicoles. Thèse de Doctorat N°1912, Université de bordeaux 1, 250 pages.

- Mora, P., Fournier, D., Narbonne, J.F.**, 1999a. Cholinesterases from the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and *M. edulis* L. from the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* Müller. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **122C**(3): 353-361.
- Mora, P., Michel, X., Narbonne, J.-F.**, 1999b. Cholinesterase activity as potential biomarker in two bivalves. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **7**(4): 253-260.
- Morcillo, Y. & Porte, C.**, 2000. Evidence of endocrine disruption in clams -- *Ruditapes decussata* -- transplanted to a tributyltin-polluted environment. *Environmental Pollution*, **107**(1): 47-52.
- Morel, F.M.M. & Hering, J.G.**, 1993. Principles and applications of aquatic chemistry. New York, Wiley-Interscience. 588 p.
- Mori, K.**, 1968a. Effect of steroid on oyster -I. Activation of respiration in gonad by estradiol-17 β . *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, **34**(10): 915-919.
- Mori, K.**, 1968b. Effect of steroid on oyster -II. Increase in rates of fertilization and development by estradiol-17 β . *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, **34**(11): 997-999.
- Mori, K.**, 1969. Effect of steroid on oyster - III. Sex reversal from male to female in *Crassostrea gigas* by estradiol-17 β . *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, **35**(11): 1072-1076.
- Mori, K., Muramatsu, T., Nakamura, Y.**, 1969. Effect of steroid on oyster - IV. Acceleration of sexual maturation in female *Crassostrea gigas* by estradiol-17 β . *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, **35**(11): 1077-1079.
- Mori, K.**, 1980. Physiological effects of 17 β -estradiol on the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Proceedings of the North Pacific Aquaculture Symposium, Anchorage, Alaska (USA)*: 305-317.
- Morin, B., Pannier, G., Clérandeau, C., Malidor, A., Narbonne, J.F., Geffard, O., Budzinski, H.**, 2003. DNA oxidative damage in term of 8-oxo-7, 8-dihydro-2-deoxyguanosine in the mussel *Mytilus* sp. tissue differences and sex-related response. "Biological effects of pollutants the role of environmental proteomics and genomics" Symposium Alessandria, Italy, (14-18 december).
- Morrero, R. & Marnett, L.J.**, 1993. The role of organic peroxy radicals in carcinogenesis. in "DNA and free radicals". Halliwell, B. & Aruoma, O.I. (Eds.). England, Ellis Horwood Limited: 145-162.
- Mortensen, S. & Glette, J.**, 1996. Phagocytic activity of scallop (*Pecten maximus*) haemocytes maintained in vitro. *Fish & Shellfish Immunology*, **6**(2): 111-121.
- Morton, B.S.**, 1970. A note on the cytological structure and function of the digestive diverticula of *Macoma balthica* correlated with the rhythm of the tide. *Malacology Reviews*, **3**: 115-119.
- Motavkine, P.A. & Varaksine, A.A.**, 1989. La reproduction chez les mollusques bivalves. Rôle du système nerveux et régulation, traduit du russe par C. Bellon-Humbert. Rapports scientifiques et techniques de l'IFREMER. 247 p.
- Moura, G., Vilarinho, L., Santos, A.C., Machado, J.**, 2000. Organic compounds in the extrapalial fluid and haemolymph of *Anodonta cygnea* (L.) with emphasis on the seasonal biomineralization process. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **125**(3): 293-306.
- Munkittrick, K.R., Van Der Kraak, G.I., Mc Master, M.E., Portt, C.B.**, 1992. Reproductive dysfunction MFO activity in three species of fish exposed to bleached kraft mill effluent at Jackfish Bay, Lake Superior. *Water Quality Research Journal of Canada*, **27**(3): 439-446.
- Munkittrick, K.R., Van Der Kraak, G.V., Mc Master, M.E., Portt, C.B., Van Den Heudel, M.R., Servos, M.R.**, 1994. Survey of receiving-water environmental impacts associated with discharges from pulp mills. 2- gonad size, liver size, hepatic EROD activity & plasma sex steroid levels in the white sucker. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **13**(7): 1089-1101.
- Murata-Kamiya, N., Kamiya, H., Iwamoto, N., Kasai, H.**, 1995. Formation of a mutagen, glyoxal, from DNA treated with oxygen free radicals. *Carcinogenesis*, **16**(9): 2251-2253.
- Nagabhushanam, R.**, 1964. Effect of removal of neurosecretory cells on spawning in the mussel *Modiolus demissus* (Mollusca: Lamellibranchiata). *Current Sciences*, **33**(7): 215-216.
- Nagashima, M., Tsuda, H., Takenoshita, S., Nagamachi, Y., Hirohashi, S., Yokota, J., Kasai, H.**, 1995. 8-hydroxydeoxyguanosine levels in DNA of human breast cancer are not significantly different from those of non-cancerous breast tissues by the HPLC-ECD method. *Cancer Letters*, **90**(2): 157-162.
- Narbonne, J.F., Djomo, J.E., Ribera, D., Ferrier, V., Garrigues, P.**, 1999a. Accumulation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed to sediment by the mollusk *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **42**(1): 1-8.

- Narbonne, J.F., Mora, P., Michel, X., Budzinski, H., Garrigues, P.**, 1999b. Biological markers of environmental contamination in marine ecosystems : BIOMAR project. *Journal of Toxicology and Toxin Review*, **18**(3-4): 205-220.
- Narbonne, J.-F. & Gallis, J.L.**, 1979. *In vitro* and *in vivo* effect of pchlor DP6 on drug metabolizing activity in mullet liver. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **23**: 344-348.
- Narbonne, J.-F. & Michel, X.**, 1993. Use of biomarkers in assessment of contamination in marine ecosystems. Fundamental approach and applications. *Mediterranean Action Plan Technical Report Series*, **71**: 1-20.
- Narbonne, J.-F., Daubèze, M., Clérandeau, C., Guarrigues, P.**, 1999. Scale of classification based on biochemical markers in mussels: application to pollution monitoring in European coasts. *Biomarkers*, **4**(6): 415-424.
- Narbonne, J.-F.**, 2000. History - Biological basis of the use of biomarkers in ecotoxicology. in "*Use of biomarkers for quality environmental quality assessment*". Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C., Ramade, F. (Eds.). Enfield, USA, Plymouth, UK, Science Publishers, Inc.: 350 p.
- Nesto, N., Bertoldo, M., Nasci, C., Da Ros, L.**, 2004. Spatial and temporal variation of biomarkers in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Lagoon of Venice, Italy. *Marine Environmental Research*, **58**(2-5): 287-291.
- Noda, T. & Farquhar, M.G.**, 1992. A non-autophagic pathway for division of ER secretory proteins to lysosomes. *Journal of Cell Biology*, **119**: 85-97.
- Nott, J.A. & Moore, M.N.**, 1987. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on molluscan lysosomes and endoplasmic reticulum. *Histochemical Journal*, **19**(6-7): 357-368.
- OCDE**, 1997. Draft detailed review paper: appraisal of test methods for sex-hormone disrupting chemicals. 290 p.
- Oehlmann, J., Bauer, B., Minchin, D., Schulte-Oehlmann, U., Fioroni, P., Mackert, B.**, 1998. Imposex in *Nucella lapillus* and intersex in *Littorina littorea*: interspecific comparison of two TBT-induced effects and their geographical uniformity. *Hydrobiologia*, **378**: 199-213.
- Ohkuma, S., Livingstone, D.R., Widdows, J., Lowe, D.M., Pipe, R.K.**, 1987. Molecular, cellular and physiological effects of oil-delivered hydrocarbons on molluscs and their use in impact assessment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*, **B316**: 603-623.
- Olabarrieta, I., L'Azou, B., Yuric, S., Cambar, J., Cajaraville, M.P.**, 2001. *In vitro* effects of cadmium on two different animal cell models. *Toxicology in Vitro*, **15**(4-5): 511-517.
- Osada, M. & Nomura, T.**, 1989a. Seasonal variations of catecholamine levels in the tissue of the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **93C**(1): 171-179.
- Osada, M. & Nomura, T.**, 1989b. Estrogen effect on the seasonal levels of catecholamines in the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **93C**(2): 349-353.
- Ostrander, G. & Rotchell, J.**, 2003. Molecular markers of endocrine disruption in aquatic organisms. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B - Critical Reviews*, **6**(5): 453-496.
- Owen, G.**, 1972. Lysosomes, peroxisomes and bivalves. *Science Progress Oxford*, **60**: 299-318.
- Pakkenberg, B. & Gundersen, H.J.**, 1988. Total number of neurons and glial cells in human brain nuclei estimated by the disector and the fractionator. *Journal of Microscopy*, **158**: 1-20.
- Pani, A.K. & Croll, R.P.**, 2000. Catechol concentrations in the hemolymph of the scallop, *Placopecten magellanicus*. *General and Comparative Endocrinology*, **118**(1): 48-56.
- Patel, B., Chandy, J.P., Patel, S.**, 1988. Do selenium and glutathione inhibit the toxic effects of mercury in marine lamellibranchs? *The Science of the Total Environment*, **76**(2-3): 147-165.
- Payne, J.**, 1976. Field evaluation of benzo(a)pyrene hydroxylase induction as a monitor for marine petroleum pollution. *Science*, **191**: 945-946.
- Pereira, L.S., Oliveira, P.L., Barja-Fidalgo, C., Daffre, S.**, 2001. Production of Reactive Oxygen Species by Hemocytes from the Cattle Tick *Boophilus microplus*. *Experimental Parasitology*, **99**(2): 66-72.
- Perkins, E.J., Jr. & Schlenk, D.**, 2000. *In vivo* acetylcholinesterase inhibition, metabolism, and toxicokinetics of aldicarb in channel catfish: role of biotransformation in acute toxicity. *Toxicological Sciences*, **53**(2): 308-315.
- Pipe, R.K., Coles, J.A., Thomas, M.E., Fossato, V.U., Pulsford, A.L.**, 1995. Evidence for environmentally derived immunomodulation in mussels from the Venice Lagoon. *Aquatic Toxicology*, **32**(1): 59-73.

- Pipe, R.K., Coles, J.A., Carissan, F.M.M., Ramanathan, K.**, 1999. Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, **46**(1): 43-54.
- Plum, G.E., Grollman, A.P., Johnson, F., Breslauer, K.J.**, 1995. Influence of the oxidatively damaged adduct 8-oxodeoxyguanosine on the conformation, energetics, and thermodynamic stability of a DNA duplex. *Biochemistry*, **34**(49): 16148-16160.
- Portmann, J.E.**, 1975. The bioaccumulation and effects of organochlorine pesticides in marine animals. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **189**(1096): 291-304.
- Postuma, L. & Van Straalen, N.M.**, 1993. Heavy metal adaptation in terrestrial invertebrates : a review of occurrence, genetics, physiology and ecological consequences. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **106C**(1): 65-70.
- Propst, T.L., Lochmiller, R.L., Qualls, C.W., Jr., McBee, K.**, 1999. *In situ* (mesocosm) assessment of immunotoxicity risks to small mammals inhabiting petrochemical waste sites. *Chemosphere*, **38**(5): 1049-1067.
- Prowse, R.H. & Tait, N.N.**, 1969. *In vitro* phagocytosis by amoebocytes from the haemolymph of *Helix aspersa* (Müller). I. Evidence for opsonic factor(s) in serum. *Immunology*, **17**(3): 437-443.
- Puinean, A.M., Rotchell, J., Peck, M., Hill, E.**, 2004. Isolation of the vitellogenin gene from an aquatic invertebrate, *Mytilus edulis* and its development as a quantitative biomarker of endocrine disruption., non publié, soumission directe de la protéine AAT72932 à <http://genome.jp>
- Purdom, C.E., Hardiman, P.A., Bye, V.J., Eno, N.C., Tyler, C.R., Sumpter, J.P.**, 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chemistry and Ecology*, **8**(4): 275-285.
- Quinn, B., Gagné, F., Costello, M., McKenzie, C., Wilson, J., Mothersill, C.**, 2004. The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquatic Toxicology*, **66**(3): 279-292.
- Ramana, C.V., Boldogh, I., Izumi, T., Mitra, S.**, 1998. Activation of apurinic/aprimidinic endonuclease in human cells by reactive oxygen species and its correlation with their adaptive response to genotoxicity of free radicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**(9): 5061-5066.
- Randerath, E., Reddy, M.V., Gupta, R.C.**, 1981. ³²P-postlabelling analysis for DNA damage. *Proceedings of National Academic Sciences USA*, **78**: 6126-6129.
- Regoli, F.**, 1992. Lysosomal responses as a sensitive stress index in biomonitoring heavy metal pollution. *Marine Ecology Progress*, **84**: 63-69.
- Regoli, F., Nigro, M., Bertoli, E., Principato, G., Orlando, E.**, 1997. Defense against oxidative stress in the Antarctic scallops *Adamussium colbecki* and effects of acute exposure to metals. *Hydrobiologia*, **355**: 139-144.
- Regoli, F., Nigro, M., Orlando, E.**, 1998. Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Aquatic Toxicology*, **40**: 375-392.
- Reid, R.G.B., McMahon, R.F., Foighil, D.O., Finnigan, R.**, 1992. Anterior inhalant currents and pedal feeding in bivalves. *The Veliger*, **35**(2): 93-104.
- Reis-Henriques, M.A., Le Guellec, D., Remy-Martin, J.P., Adessi, G.L.**, 1990. Studies of endogenous steroids from the marine mollusc *Mytilus edulis* L. by gas chromatography and mass spectrometry. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **95B**(2): 303-309.
- Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin**, 1988. Surveillance du milieu marin. IFREMER. DERO/EL/RNO/56/MJ, 88.1-35p.
- Ribera, D., Narbonne, J.-F., Michel, X., Livingstone, D.R., O'Hara, S.**, 1991. Responses of antioxidants and lipid peroxidation in mussels to oxidative damage exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **100C**(1-2): 177-181.
- Ribera, D., Narbonne, J.F., Arnaud, C., Saint-Denis, M.**, 2001. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil, effects of carbaryl. *Soil Biology and Biochemistry*, **33**: 1123-1130.
- Robohm, R.A.**, 1984. *In vitro* phagocytosis by molluscan hemocytes: a survey and critique of methods. *Comparative Pathology*, **6**: 147-172.

- Roch, M., Mc Carter, J.A., Matheson, A.T., Clark, M.J.R., Olafson, R.W.,** 1982. Hepatic metallothionein in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) as an indicator of metal pollution in the Campbell River system. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **39**: 1596-1601.
- Rodgers, K.,** 1995. The immunotoxicity of pesticides in rodents. *Human Experimental Toxicology*, **14**(1): 111-113.
- Roesijadi, G. & Robinson, W.E.,** 1994. Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation, and release. in "*Aquatic toxicology: molecular, biochemical, and cellular perspectives*". Malins, D.C. & Ostrander, G.K. (Eds.). Boca Raton, CRC Press, Inc.: 387-420.
- Romeo, M., Mourgaud, Y., Geffard, A., Gnassia-Barelli, M., Amiard, J.C., Budzinski, H.,** 2003. Multimarker approach in transplanted mussels for evaluating water quality in Charentes, France, coast areas exposed to different anthropogenic conditions. *Environmental Toxicology*, **18**(5): 295-305.
- Roméo, M., Bennani, N., Gnassia-Barelli, M., Lafaurie, M., Girard, J.-P.,** 2000. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquatic Toxicology*, **48**: 185-194.
- Ronis, M.J.J. & Mason, A.Z.,** 1996. The metabolism of testosterone by the Periwinkle (*Littorina littorea*) *in vitro* and *in vivo*: effects of tributyl tin. *Marine Environmental Research*, **42**(1-4): 161-166.
- Sanchez-Dardon, J., Voccia, I., Hontela, A., Chilmonczyk, S., Dunier, M., Boermans, H., Blakley, B., Fournier, M.,** 1999. Immunomodulation by heavy metals tested individually or in mixtures in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed *in vivo*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **18**(7): 1492-1497.
- Sauvé, S., Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Senecal, L., Goudreau, P., Fournier, M.,** 2002. Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: *in vitro* exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquatic Toxicology*, **58**(3-4): 189-200.
- Schulte-Oehlmann, U., Oehlmann, J., Fioroni, P., Bauer, B.,** 1997. Imposex and reproductive failure in *Hydrobia ulvae* (Gastropoda: Prosobranchia). *Marine Biology*, (128): 257-266.
- Schultz, T.W. & Kennedy, J.R.,** 1976. The fine structure of the digestive system of *Daphnia pulex* (Crustacea: Cladocera). *Tissue & Cell*, **8**(3): 479-490.
- Serrano, T., Cajaraville, M.P., Marigómez, I., Ferrero, G., Galaz, J.M., Mancha, A., Mendez, K., Angulo, E.,** 1992. Variability in the digestive gland condition of mussels in relation with a pollution gradient in the estuary of Urdaibai. "*IX Congreso Nacional de Malacología*" Bilbao,
- Shao, F., Lin, W., Wang, W., Washington, W.C., Jr., Zheng, L.,** 2003. The effect of emotional stress on the primary humoral immunity of rats. *Journal of Psychopharmacology*, **17**(2): 179-183.
- Shepard, J.L. & Bradley, B.P.,** 2000. Protein expression signatures and lysosomal stability in *Mytilus edulis* exposed to graded copper concentrations. *Marine Environmental Research*, **50**(1-5): 457-463.
- Shigenaga, M.K., Abajaoude, E.N., Chen, Q., Ames, B.N.,** 1994. Assays of oxidative DNA damage biomarkers 8-oxo-2'-deoxyguanosine and 8-oxoguanine in nuclear DNA and biological fluids by High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *Methods in Enzymology*, **234**: 16-33.
- Siah, A., Pellerin, J., Benosman, A., Gagné, J.-P., Amiard, J.-C.,** 2002. Seasonal gonad progesterone pattern in the soft-shell clam *Mya arenaria*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, **132**(2): 499-511.
- Siah, A., Pellerin, J., Amiard, J.-C., Pelletier, É., Viglino, L.,** 2003. Delayed gametogenesis and progesterone levels in soft-shell clams (*Mya arenaria*) in relation to *in situ* contamination to organotins and heavy metals in the St. Lawrence River (Canada). *Comparative Biochemistry and Physiology*, **135A**(2): 145-156.
- Sickel, J.B.,** 1986. Corbicula population mortalities: factors influencing population control. *American Malacology Bulletin, Spec. Ed.* **2**: 89-94.
- Soto, M. & Marigómez, I.,** 1997. BSD Extent, an index for metal pollution screening based on the metal content within digestive cell lysosomes of mussels as determined by autometallography. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **37**(2): 141-151.
- Spooner, N., Gibbs, P.E., Bryan, G.W., Goad, L.J.,** 1991. The effect of tributyltin upon steroid titers in the female dogwhelk *Nucella lapillus*, and the development of imposex. *Marine Environmental Research*, **32**(1): 37-49.

- Springborn Laboratories Inc. (SLI)**, 1997. Methyl Methacrylate – the chronic toxicity to *Daphnia magna* under flow through conditions. SLI report #96-12-6804, study # 13536.0696.6120.130, submitted to Methacrylates Producers Association. Final report, 7 March 1997. 100 p.
- Stanton, M.G.**, 1968. Colorimetric determination of inorganic phosphate in the presence of biological material and adenosine triphosphate. *Analytical Biochemistry*, **22**: 27-34.
- Stefano, G.B. & Catapane, E.**, 1977. Seasonal monoamine changes in the central nervous system of *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Experientia*, **33**(10): 1341-1342.
- Stegeman, J.J., Brouwer, M., Di Giulio, R.T., Förlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M., Van Veld, P.A.**, 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. in "*Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*". R. Huggett, R.K., P. Mehrle and H. Bergman (Eds.). Boca Raton, FL, Lewis: 235-335.
- Stentiford, G.D., Longshaw, M., Lyons, B.P., Jones, G., Green, M., Feist, S.W.**, 2003. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Marine Environmental Research*, **55**(2): 137-159.
- Sterio, D.C.**, 1984. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *Journal of Microscopy*, **134**: 127-136.
- Sternlieb, I. & Goldfisher, S.**, 1976. Heavy metals and lysosomes. in "*Lysosomes in Biology and Pathology*". Dingle, J.T. & Dean, R.T. (Eds.). Amsterdam, North Holland-American Elsevier. **5**: 185-197.
- Svensen, C. & Weeks, J.M.**, 1995. The use of a lysosome assay for the rapid assessment of cellular stress from copper to the freshwater snail *Viviparus contectus* (Millet). *Marine Pollution Bulletin*, **31**(1-3): 139-142.
- Tafalla, C., Gomez-Leon, J., Novoa, B., Figueras, A.**, 2003. Nitric oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes. *Developmental & Comparative Immunology*, **27**(3): 197-205.
- Tatem, H.E.**, 1986. Bioaccumulation of polychlorinated biphenyls and metals from contaminated sediment by freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii* and clams, *Corbicula fluminea*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **15**(2): 171-183.
- Tavan, E.**, 2001. Modulation, par les laits fermentés, de la concérogenèse colique induite par des contaminants alimentaires, les amines aromatiques hétérocycliques, chez le rat. Thèse de Doctorat N° 2354, Université de Bordeaux 1, 204 pages
- Tollefsen, K.E.**, 2002. Interaction of estrogen mimics, singly and in combination, with plasma sex steroid-binding proteins in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, **56**(3): 215-225.
- Tran, D.**, 2001. Etude des mécanismes de régulation de la ventilation chez le bivalve *Corbicula fluminea*. Influence de l'oxygène et de l'apport trophique. Application aux problèmes de bioaccumulation et de biodétection du cadmium. Thèse de doctorat N° 2320, Université de Bordeaux 1, 141 pages
- Tran, D., Boudou, A., Massabuau, J.C.**, 2002. Relationship between feeding-induced ventilatory activity and bioaccumulation of dissolved and algal-bound cadmium in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **21**(2): 327-333.
- Tran, D., Ciret, P., Ciutat, A., Durrieu, G., Massabuau, J.C.**, 2003. Estimation of potential and limits of bivalve closure response to detect contaminants: application to cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **22**(4): 914-920.
- Tremblay, R. & Pellerin-Massicotte, J.**, 1997. Effect of the tidal cycle on lysosomal membrane stability in the digestive gland of *Mya arenaria* and *Mytilus edulis* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, **117**(1): 99-104.
- Tremblay, R., Myrand, B., Guderley, H.**, 1998. Temporal variation of lysosomal capacities in relation to susceptibility of mussels, *Mytilus edulis*, to summer mortality. *Marine Biology*, **132**(4): 641-649.
- Tripp, M.R.**, 1992a. Agglutinins in the hemolymph of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **59**(3): 228-234.
- Tripp, M.R.**, 1992b. Phagocytosis by hemocytes of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **59**(3): 222-227.
- Tsuji, T.**, 1960. Studies on the mechanisms of shell and pearl formation in Mollusca. *J. Fac. Fish. Prefect. Univ.*, **5**: 1-70.
- Tyler, C.R., Jobling, S., Sumpter, J.P.**, 1998. Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. *Critical Reviews in Toxicology*, **28**(4): 319-361.

- UNEP/RAMOGGE, 1999. Manual on the Biomarkers Recommended for the MEDPOL Biomonitoring Programme. UNEP.
- van der Knaap, W.P., Meuleman, E.A., Sminia, T., 1987. Alterations in the internal defence system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* induced by infection with the schistosome *Trichobilharzia ocellata*. *Parasitology Research*, **73**(1): 57-65.
- van der Velde, G., Hermus, K., van der Gaag, M., Jenner, H., 1992. Cadmium, zinc and copper in the body, byssus and shell of the mussels, *Mytilopsis leucophaeta* and *Dreissena polymorpha* in the brackish noordzeekanaal of the Netherlands. *Limnologie Aktuell*, **2**: 213-226.
- Varute, A.T. & More, N.K., 1973. Lysosomal acid hydrolases in the chloragogen cells of earthworms. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **45A**(2): 607-635.
- Vasseur, P. & Cossu-Leguille, C., 2003. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environment International*, **28**(8): 711-717.
- Viarengo, A., Moore, M.N., Mancinelli, G., Mazzucotelli, A., Pipe, R.K., 1985. Significance of metallothioneins and lysosomes in cadmium toxicity and homeostasis in the digestive gland cells of mussels exposed to the metal in presence or absence of phenanthrene. *Responses of Marine Organisms to Pollutants*, **17**: 184-187.
- Viarengo, A., 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *Aquatic Sciences*: 295-317.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., 1995. Stress on stress response: a simple monitoring tool in the assessment of a general stress syndrome in mussels. *Marine Environmental Research*, **39**: 245-248.
- Viarengo, A., Burlando, B., Giordana, A., Bolognesi, C., Gabrielides, G.P., 2000. Networking and expert-system analysis: next frontier in biomonitoring. *Marine Environmental Research*, **49**(5): 483-486.
- Vidal, M.L. & Narbonne, J.F., 2000. Characterization of glutathione S-transferase activity in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **64**(3): 455-462.
- Vidal, M.L., 2001. Etude de marqueurs biochimiques de pollution chez le mollusque bivalve d'eau douce *Corbicula fluminea* (Müller) - Purification et caractérisation des glutathion-S-transférases. Thèse de Doctorat N°2315, Université de Bordeaux 1, 284 pages
- Vidal, M.L., Bassères, A., Narbonne, J.F., 2001a. Interest of a multibiomarker approach in the assessment of freshwater ecosystem quality: laboratory and field studies. *Water Science and Technology*, **44**(2-3): 305-312.
- Vidal, M.L., Bassères, A., Narbonne, J.-F., 2001b. Potential biomarkers of trichloroethylene and toluene exposure in *Corbicula fluminea*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **9**: 87-97.
- Vidal, M.L., Bassères, A., Narbonne, J.-F., 2002. Seasonal variations of pollution biomarkers in two populations of *Corbicula fluminea* (Müller). *Comparative Biochemistry and Physiology*, **131C**(2): 133-151.
- Ville, P., Roch, P., Cooper, E.L., Narbonne, J.-F., 1997. Immuno-modulator effects of carbaryl and 2,4 D in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **32**(2): 291-297.
- Vogel, G., Thilo, L., Schwarz, H., Steinhart, R., 1980. Mechanism of phagocytotic recognition sites as disclosed by mutants with altered phagocytotic properties. *Journal of Cell Biology*, **86**: 456-465.
- Vos, J.G., 1980. Immunotoxicity assessment: screening and function studies. *Archives of Applied Toxicology Suppl.*, **4**: 95-108.
- Vos, J.G., Krajnc, E.I., Beekhof, P., 1982. Use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in immunotoxicity testing. *Environmental Health Perspectives*, **43**: 115-121.
- Vos, J.G. & Krajnc, E.I., 1983. Immunotoxicity of pesticides. *Development in Toxicology and Environmental Sciences*, **11**: 229-240.
- Wallace, S.S., 2002. Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radical Biology and Medicine*, **33**(1): 1-14.
- Walne, P.R. & Mann, R., 1975. Growth and biochemical composition *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. "9th European Marine Biology Symposium" Aberdeen, Scotland, Aberdeen Univ. Press, 587-607.
- Walsh, A.R. & O'Halloran, J., 1998. Accumulation of chromium by population of mussels (*Mytilus edulis* (L.)) exposed to leather tannery effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **17**(7): 1429-1438.

- Way, C.M., Hornbach, D.J., Miller-Way, C.A., Payne, B.S., Miller, A.C.**, 1990. Dynamics of filter feeding in *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculidae). *Canadian Journal of Zoology*, **68**: 115-120.
- Weibel, E.R., Staübli, W., Gnägi, H.R., Hess, F.A.**, 1969. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. *Journal of Cell Biology*, **42**: 68-91.
- Weibel, E.R.**, 1979. Practical methods for biological morphometry. in "Stereological methods". Parsons, D.F. (Eds.). London, Academic Press: 415.
- Welch, A.B.**, 1978. Effect of Simplex liquid methyl methacrylate monomer on cells. *Journal of Biomedical Material Research*, **12**(6): 775-790.
- Westermann, B. & Schipp, R.**, 1998. Cytological and enzyme-histochemical investigations on the digestive organs of *Nautilus pompilius* (Cephalopoda, Tetrabranchiata). *Cell and Tissue Research*, **293**(2): 327-336.
- Wiesner, A., Wittwer, D., Gotz, P.**, 1996. A small phagocytosis stimulating factor is released by and acts on phagocytosing *Galleria mellonella* haemocytes *in vitro*. *Journal of Insect Physiology*, **42**(9): 829-835.
- Winstead, J.T.**, 1995. Digestive tubule atrophy in eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), exposed to salinity and starvation stress. *Journal of Shellfish Research*, **14**: 105-111.
- Winston, G.W., Moore, M.N., Straasburg, I., Kirchin, M.A.**, 1991. Decreased stability of digestive gland lysosomes from the common mussel *Mytilus edulis* L. by *in vitro* generation of oxygen free radicals. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **21**: 401-408.
- Winzer, K., Becker, W., Van Noorden, C.J.F., Köhler, A.**, 2000. Shorttime induction of oxidative stress in hepatocytes of the European flounder (*Platichthys flesus*). *Marine Environmental Research*, **50**: 495-501.
- Wolff, E.W. & Peel, D.A.**, 1994. Assessing global and local pollution for heavy metals in Antarctica. *Analisis Magazine*, **22**(7): 41-43.
- Wootton, E.C., Dyrzynda, E.A., Pipe, R.K., Ratcliffe, N.A.**, 2003. Comparisons of PAH-induced immunomodulation in three bivalve molluscs. *Aquatic Toxicology*, **65**(1): 13-25.
- Wright, D.A. & Welbourn, P.M.**, 1994. Cadmium in the aquatic environment: a review of ecological, physiological, and toxicological effects on biota. *Environmental Review*, **2**: 187-214.
- Yamuna, A., Saravana Bhavan, P., Geraldine, P.**, 2002. Effects of Hg and Cu on hemocytes-mediated functions in the prawn, *Macrobrachium malcolmsonii*. *Journal of Environmental Biology*, **23**(1): 7-13.
- Yang, R. & Yoshino, T.P.**, 1990. Immunorecognition in the freshwater bivalve, *Corbicula fluminea*. I. Electrophoretic and immunologic analyses of opsonic plasma components. *Developmental and Comparative Immunology*, **14**(4): 385-395.
- Yonge, M.C.**, 1926. Structure and physiology of the organs of the feeding and digestion in *Ostrea edulis*. *Journal of Marine Biology Assoc. U.K.*, **14**: 295-388.
- Yu, T.-W. & Anderson, D.**, 1997. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. *Mutation Research*, **379**: 201-210.
- Zandee, D.I., Kluytmans, J.H., Zurburg, W., Pieters, H.**, 1980. Seasonal variations in biochemical composition of *Mytilus edulis* with reference to energy metabolism and gametogenesis. *Netherlands Journal of Sea Research*, **14**(1): 1-29.
- Zatta, P., Gobbo, S., Rocco, P., Perazzolo, M., Favarato, M.**, 1992. Evaluation of heavy metal pollution in the Venetian lagoon by using *Mytilus galloprovincialis* as biological indicator. *The Science of The Total Environment*, **119**: 29-41.

Annexe

COMBINED EFFECTS OF ULTRAVIOLET-B RADIATION AND FOOD SHORTAGE ON THE SENSITIVITY OF THE ANTARCTIC AMPHIPOD *PARAMOERA WALKERI* TO COPPER

MATTHIAS LIESS,*† OLIVIER CHAMPEAU,‡ MARTIN RIDDLE,§ RALF SCHULZ,|| and SABINE DUQUESNE#

†Department of Chemical Ecotoxicology, UFZ Center for Environmental Research, Permoserstrasse 15, D-04318 Leipzig, Germany

‡Universite Bordeaux 1, Toxicologie Alimentaire, Avenue des Facultes, 33405 Talence Cedex, France

§Australian Antarctic Division, Human Impacts Research Program, Channel Highway, Kingston, Tasmania 7050, Australia

||Technical University, Zoological Institute, Fasanenstrasse 3, D-38092 Braunschweig, Germany

#National Research Centre for Environmental Toxicology, University of Queensland, 39 Kessels Road, Coopers Plains QLD4108, Australia

(Received 31 August 2000; Accepted 15 February 2001)

Abstract—Investigations on the combined effects of ultraviolet (UV)-B radiation and anthropogenic toxicants have focused primarily on the chemical interactions between UV-B and organic compounds. Only a few studies have examined whether exposure to UV-B changes sensitivity to toxicants. This question is addressed in a laboratory study using the common shoreline Antarctic amphipod *Paramoera walkeri* and exposure to environmentally realistic levels of copper, UV-B radiation, and food shortage. Exposure to copper for 21 d in the absence of any additional stressors (food present, no UV-B) showed a lowest observable effective concentration (LOEC) of greater than 100 µg Cu/L. Exposure to copper and UV-B in combination, with no shortage of food, resulted in a LOEC of 45 µg Cu/L. When exposed to copper and UV-B, with shortage of food, a LOEC of 3 µg Cu/L was recorded. Hence, the combination of environmental stress from exposure to UV-B radiation and shortage of food increases the sensitivity of *P. walkeri* to copper more than 30-fold. Increased metabolic energy requirements for defense mechanisms in response to toxicants and UV-B are discussed as possible explanations. It is concluded that consideration of environmental stressors in combination with toxicants increases the accuracy of ecological risk assessments of toxicants and should be part of the process for developing guidelines for ecologically acceptable concentrations of contaminants in the environment.

Keywords—Environmental stressors Ultraviolet-B Food shortage Toxicity Polar Crustacea

INTRODUCTION

Several investigations revealed that stressful environmental conditions increase the sensitivity of organisms to toxicants. For example, drought increases the sensitivity of spiders to the pesticide deltamethrin [1] and of earthworms to copper [2]. Low concentrations of oxygen also increases the sensitivity of the cladoceran *Daphnia pulex* to the pesticide carbaryl [3] and to organic chemicals in a model population of *Daphnia magna* [4].

Adverse biological effects caused by UV-B radiation alone have been well documented for phytoplankton and zooplankton in both marine and freshwater ecosystems [5,6]. In the marine environment inhibition of biological processes due to UV-B has been observed to depths of 20 to 30 m [7]. Investigations of the combined effects of UV-B and anthropogenic toxicants have focused primarily on the chemical interactions between UV-B and organic compounds. For example, exposure to UV light causes chemical changes in PAHs, which increase their toxicity [8]. In contrast, UV-B radiation is not expected to bring about chemical changes in heavy metals that could alter their toxicity.

The gammarid amphipod *Paramoera walkeri* is the dominant macroinvertebrate in the Antarctic shoreline community [9]. It has a circumpolar distribution, and occurs from 0 to 15 m depth [10]. It moves off the bottom during late autumn and then is found clinging to the underside of the ice [11]. Its widespread distribution and its occurrence in the zone where ecological effects of UV-B are possible [7] are the main reasons

for selecting this species. In addition, it was previously proposed as a species useful for monitoring heavy metal contamination [12].

Following the concept that environmental factors may modify biological response to toxicants, the combined effects of UV-B radiation, food shortage, and copper exposure were investigated using the Antarctic amphipod *P. walkeri*. The study was initiated because an ecological risk assessment conducted on the nearshore environment revealed a considerable gap between expected and observed effects of heavy metal contamination on *P. walkeri*. The mortality rate of the amphipod was increased, although the level of contamination measured in the field was far below the concentrations determined to be toxic in the laboratory [13].

Accordingly, the aim of this study was to determine if site-specific environmental stressors increase the sensitivity of amphipods to heavy metals. This experiment was designed to reveal whether UV-B radiation, which is known to be elevated in Antarctica [14], and food shortage, which occurs naturally in many populations [15], have the potential to increase the sensitivity of the amphipod *P. walkeri* to copper.

METHODS

Collection and use of P. walkeri (Amphipoda, Crustacea)

During the Antarctic summer of 1999–2000, amphipods were collected using hand nets along the rocky shoreline in the region of Casey Station, Antarctica (66°17'S, 110°30'E) from sites sufficiently far enough (>5 km) from the station that they are unlikely to be influenced by contamination orig-

* To whom correspondence may be addressed (ml@uoe.ufz.de).

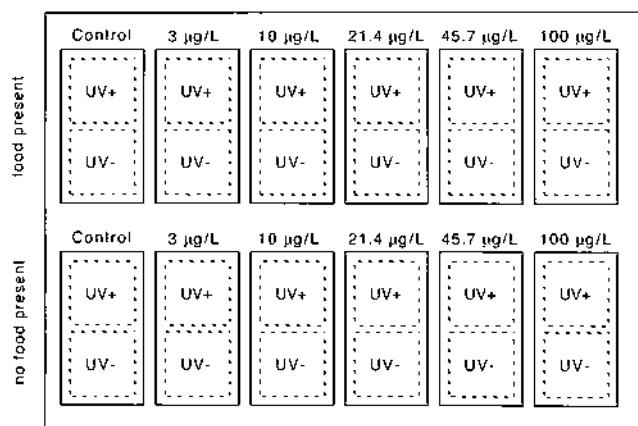


Fig. 1. Design of the test system.

inating from station activities. Specimens were brought back to the laboratory in fresh seawater and kept in aerated seawater at -1.25°C for 48 h prior to experiments. Animals were sorted before testing, and only the healthy animals were retained.

Description of test systems

Seventy-five gammarids were placed in each of 24 test enclosures. The enclosures were suspended in pairs at the water surface in 12 35-L glass aquaria containing water held at $-1.25 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$. The enclosures measured 17 cm along each side, were 3.5 cm high, were solid along the side, and were open at the bottom to allow free exchange of water between the enclosures and the aquarium. The bottom of the enclosure was made of 0.5-mm mesh to retain the animals. The top of one of the pair of enclosures in each aquarium was made of UV-B transmitting material, and the other was made of UV-B absorbing material. This setup ensured identical water quality in the two test enclosures in each aquarium with each of them receiving different UV treatments (UV-B+ and UV-B-).

In six of the units (Fig. 1), animals were fed 5 mg of bread every 3 d and treated with one of a range of copper concentrations (0, 3, 10, 21.4, 45.7, or 100 $\mu\text{g/L}$). In the six other units, animals were not fed and were treated with the same copper concentrations. Half the water in each of the 35-L aquaria was replaced every 3 d with fresh filtered seawater with copper added according to the treatment.

The numbers of animals surviving after 5, 12, and 21 d were recorded. The results after 5 d of exposure are not shown, as no significant differences were observed in any of the treatments by then. Temperature, salinity, pH, NO_2 , and NH_4 of the water in each aquarium were measured every 3 d with various WTW instruments (Wissenschaftlich Technische Werkstätten, Weilheim, Germany, Colorimetric Test Merk, Germany). The mean temperature was -1.25°C with a range of -1.5°C to -1.2°C ; the mean salinity was 33.91‰ with a range of 33.8 to 34.0‰; the mean pH was 7.97 with a range of 7.8 to 7.9, NO_2^- was less than 0.005 mg/L, and NH_4^+ was less than 0.02 mg/L. Accordingly, water quality is regarded to be suitable for maintaining the test organisms.

UV-B radiation

Fifteen-watt UV-B tubes (T-15M, Vilber-Lourmat, France) were placed 30 cm above the water surface of the aquaria. The vessels used as control UV treatment (UV-B-) were covered with a blocking foil (txUV, Protex, Overath, Germany). A

plastic mesh was used in the UV-B+ vessels to diffuse and reduce UV-B intensity in order to obtain 0.04 to 0.05 W/m^2 UV-B at 3 cm depth in the water of the test vessels in the UV-B+ treatments. The 24-h UV-B dose was approximately 4,000 $\text{J/m}^2/\text{d}$ in the UV-B+ treatments and close to zero in UV-B- treatments. Measurements near Casey in the depth range of 0.5 to 3 m, the depth where *P. walkeri* mainly occurs, showed that during a sunny summer day at noon, the natural UV-B radiation intensity is approximately 0.3 W/m^2 . This maximum value is thus approximately one order of magnitude higher than the radiation used in the laboratory experiment. In the field, the average radiation dose is approximately 7,500 $\text{J/m}^2/\text{d}$ between 0.5 and 3 m depth during a sunny day, which is approximately twice the dose used in the laboratory experiment. In contrast, during periods of cloudy weather, natural radiation is lower than in the laboratory study. The UV-B levels were measured with a UV-B radiometer (RM 21, Dr. Gröbel UV-Elektronik GmbH, Ettlingen, Germany). Considering the high natural variability in UV-B radiation, it can be assumed that the peak intensity and the total dose of radiation used in the experiment are well within the range of natural levels and therefore that the experimental conditions are relevant for the field situation in shallow waters.

Copper contamination

Stock solutions of copper sulfate were prepared in nitric acid-rinsed glassware and stored in polyethylene bottles. Amounts of stock solutions were added to the seawater in order to obtain the equivalent of a logarithmic series of nominal copper concentrations: 0, 3, 10, 21.4, 45.7, or 100 $\mu\text{g/L}$. Fifty percent of the water in each aquarium was replaced every 3 d with fresh seawater with copper added according to the treatment. To verify the dose of copper used in the experiments, water samples from the treatments with nominal concentrations of 45.7 and 100 $\mu\text{g Cu/L}$ were analyzed by polarography (Methrohm 646 VA processor, Methrohm, Herisau, Switzerland), using the method of Ritterhoff and Zauke [16]. Mean concentrations of copper over the two experiments in these treatments were $49.7 \pm 7.7 \mu\text{g/L}$ and $111 \pm 19.2 \mu\text{g/L}$.

Data analyses

To verify results, the experiment was performed twice consecutively. Significant differences in survival between treatments were determined by chi-square analysis of 2×2 contingency tables calculating Fisher's exact test using the software StatView 4.1 for Macintosh (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Chi-square analysis was chosen because of the high number of animals (75) in each treatment and the existence of only a successive set of two experiments as replicates. In order to decrease the likelihood of a type I error, differences in survival of the amphipod *P. walkeri* compared to the control were regarded as significant only when the respective treatments of each of the two replicated experiments did show the same significant change compared to the control.

RESULTS

Response to copper in the absence of additional stressors

After 12 and 21 d exposure to copper without any additional stressors (food present, no UV-B), there was only a slight (but not significant) reduction in the survival rate of the amphipod at the highest copper concentration tested (100 $\mu\text{g/L}$). This is consistent with the limited data available on the sensitivity of this species to copper: a 4-d median lethal concentration

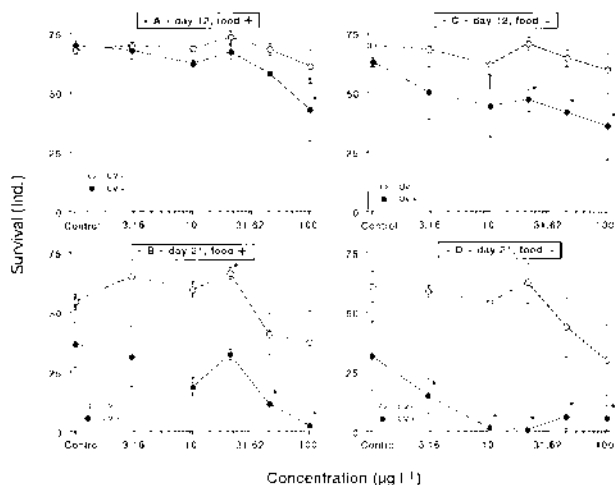


Fig. 2. Survival of the amphipod *Paramoera walkeri* after 12 and 21 d exposure to a combination of stresses (copper, ultraviolet-B, and food shortage). The averages of two experiments are shown; error bars show the results of each experiment. In order to decrease the likelihood of a type I error, differences between treatment and respective control (marked *) are indicated only if a significant difference ($p < 0.05$) was observed in both replicates of the experiment (for details, see Methods).

(LC50) of 970 $\mu\text{g/L}$ [12] and a 13-d no-observed-effect concentration (NOEC) greater than 100 $\mu\text{g/L}$ [13].

Response to copper in the presence of UV-B and with food available

After 12 d during which the animals were provided food, a significant decrease of survival (40%) was observed at the highest copper concentration tested (100 $\mu\text{g Cu/L}$) with UV-B present (UV-B+), whereas no significant reduction of survival was observed without UV-B (UV-B-) (Fig. 2A). After 21 d, a significant decrease of survival (70%) was observed at 45.7 and 100 $\mu\text{g Cu/L}$ with UV-B present; however, no significant reduction of survival was observed in response to any of the copper concentrations in the absence of UV-B (Fig. 2B), indicating that simultaneous exposure to UV-B increases the sensitivity of the amphipods to copper.

Response to copper in the presence of UV-B and with food not available

After 12 d without food, a significant decrease of survival (30%) was observed at 21 $\mu\text{g Cu/L}$ with UV-B present (UV-B+); however, no significant reduction of survival was observed in response to any of the copper concentrations in the absence of UV-B (Fig. 2C). After 21 d, a significant decrease of survival (50%) was observed at 3 $\mu\text{g Cu/L}$ in the presence of UV-B, and survival in all the higher concentrations was at least 80% lower than survival in the control. In contrast, no significant reduction of survival was observed in response to any of the copper concentrations in the absence of UV-B (Fig. 2D). The lowest-observable-effective concentration (LOEC) for copper with UV-B present and food shortage is therefore at least 30 times less than the LOEC for copper in the absence of UV-B (Fig. 2D). Thus, when food is not available, the effect of UV-B increasing the sensitivity of the amphipods to copper is enhanced.

Response to food shortage in the absence of UV-B radiation

After 12 and 21 d of exposure, no significant reduction of survival was observed at all copper concentrations, in the absence of UV-B (UV-B-), when comparing the treatments with food present and food shortage ($\chi^2 2 \times 2$ contingency tables, Fisher's exact test, not shown).

Response to food shortage in the presence of UV-B

After 21 d exposure to copper without food, a significant decrease of survival was observed with UV-B present (UV-B+) at copper concentrations of 3, 10, and 21 $\mu\text{g/L}$ shortage (χ^2 , 2×2 contingency tables, Fisher's exact test, not shown). No effect was seen with the control. No meaningful trend could be detected at concentrations of 45.7 and 100 $\mu\text{g/L}$ because at these concentrations mortality close to 100% occurs even with food present. Thus, when UV-B is present, shortage of food decreases the survival rate of *P. walkeri* exposed to low concentrations of copper.

DISCUSSION

The results indicate that fewer *P. walkeri* survive when exposed to both copper and UV-B radiation than when exposed to copper alone. This could be caused by either of two processes. The UV-B radiation could cause changes to the chemical characteristics of the copper that increase its toxicity, or the UV-B could increase the sensitivity of the amphipod to copper. The first mechanism cannot be the reason for the difference in survival between animals exposed to UV-B and those not exposed because the experimental design ensures that both treatments were immersed in seawater/copper mixtures that had been exposed to the same UV-B radiation. The test enclosures holding amphipods were floated in pairs in each of the aquaria containing the seawater/copper mixture, one of each pair of enclosures allowed exposure to UV-B, the other shielded the animals from UV-B, and the enclosures were designed so that the water from the aquaria could freely exchange with water in the enclosures. Thus, if UV-B caused a chemical change to the copper that increased its toxicity, this should have affected both the animals exposed to UV-B and the animals shielded from UV-B to the same extent. The authors are not aware of any mechanism for UV-B to change the chemical nature of copper. It is therefore assumed that the difference in survival is due to an increased sensitivity of the animals to the toxicant induced by UV-B rather than to an increased toxicity of copper due to UV-B.

It is concluded that UV-B radiation increases the sensitivity of the amphipods by reducing their fitness. Such a reduction of fitness due to UV-B, coupled with an increased sensitivity to toxicants, has been previously observed. The sensitivity of rotifers to mercury is increased as much as fivefold when exposed to UV-B [17]. A similar increased sensitivity to toxicants in the presence of UV-B was also shown for the response of fish to anthracene when exposed to sunlight [18] and the response of daphnids to PAHs in the presence of UV-B [19]. In both cases, the increased sensitivity to the toxicants was at least partly due to a reduction of individual fitness and independent of the chemical interactions between toxicant and UV radiation.

Simultaneous exposure to copper and UV-B radiation under conditions of food shortage resulted in significant mortality at much lower concentrations of copper (3 $\mu\text{g/L}$) than when food

was provided. Hence, food shortage further increased the sensitivity of amphipods to copper. This finding indicates that energy shortage, and the consequences of this to the metabolism of contaminants, can cause an increased sensitivity to copper in the amphipod or, put another way, that energy is required by the amphipod to cope with exposure to copper.

Several studies have demonstrated that animals' energy requirements are increased by toxicants at concentrations that are much lower than the concentrations that cause acute toxicity LC50. For example, endosulfane, at concentrations only slightly higher than the NOEC level, caused an increase in energy requirements in eels [20]. In gastropods, stimulation of polysaccharide-hydrolyzing enzymes by long-term sublethal exposure to hexachlorobenzene (HCB) has been demonstrated [21], suggesting that an increase in the metabolism of reserve polysaccharides (glycogen) may be involved. In freshwater prawns, malathion exposure decreased levels of hepatic glycogen by increasing metabolic demands [22], and the feeding rate of gammaridean amphipods increases when exposed to sublethal concentrations of chlorinated ethers [23].

The reverse effect, where exposure to a toxicant causes a reduction in energy requirements, has also been observed. For example, pyrethroids were found to suppress feeding in *Pieris brassicae* larvae [24], and reduced food uptake was observed for *Gammarus pulex* exposed to sublethal concentrations of metals [25]. There is some evidence that these apparently contradictory findings may be part of an overall pattern of increased metabolic activity when exposed to low concentrations (close to the NOEC), changing to decreased metabolism at higher concentrations. As an example, decapod crustaceans exposed to 2,4-D increased their oxygen consumption at a concentration of 5 µg/L and decreased it at a concentration of 50 µg/L [26]. Similar results were obtained from grunion eggs exposed to petroleum hydrocarbon [27]. The likely explanation for this is that at low concentrations energy use is increased to metabolize the toxicant but at higher concentrations the metabolic pathways are disrupted.

Evidence exists from other studies that exposure to UV-B radiation also causes an increased energy need. The UV-B tolerance of *D. pulex*, measured in terms of survival, percentage of egg-bearing individuals, and number of juveniles produced, increased with increasing food availability [28]. It has been suggested that the increased UV-B tolerance in well-fed animals (Antarctic scallop, *Adamussium colbecki*) is caused by an increase of enzymatic activities of the antioxidant defense system when digestive processes and oxygen metabolism are enhanced [29].

On the basis that energy requirements are increased by exposure to low concentrations of toxicants and to compensate the effects of UV-B radiation, the results of this study, higher sensitivity of the amphipods to copper in the presence of UV-B radiation under food shortage (Fig. 2), can be interpreted as a conflict between energy requirements and energy supply. In the presented example, this conflict may be pronounced, as there is evidence that Crustacea in polar environment have increased energetic cost of protein synthesis compared to Crustacea of temperate areas [29]. The UV-B induced sensitivity to copper is thus further increased if the amphipods are unable to increase their energy budget because of food shortage.

CONCLUSION

Exposure of the amphipod *P. walkeri* to simultaneous environmental stress from both UV-B radiation and food shortage

increased its sensitivity to copper by more than 30-fold. However, the extent to which exposure to UV-B increases sensitivity of natural populations to toxicants in the wild is still not determined. Adaptive processes, such as pigmentation [30], and behavioral responses, such as avoidance of UV-B [31,32], may moderate the effects of increased sensitivity to toxicants caused by the UV-B. Nevertheless, environmental stressors like UV-B that may have an effect that is synergistic to the detrimental effects of contaminants should be considered in ecotoxicological studies. They should also be included in the process of risk assessment for contaminated sites and when defining ecologically relevant guidelines for acceptable concentrations of environmental contaminants.

Acknowledgement—We thank the Australian Antarctic Division for its financial and logistic support in this project and the station personnel at Casey for their assistance in Antarctica. This research was supported by the grant 2228 from the Australian Science Advisory Committee.

REFERENCES

1. Everts JW, Willemsen I, Stulp M, Simons L, Aukema B, Kam-menga J. 1991. The toxic effect of deltamethrin on Linyphyid and Erigonid spiders in connection with ambient temperature, humidity and predation. *Arch Environ Contam Toxicol* 20:20–24.
2. Holmstrup M, Petersen BF, Larsen MM. 1998. Combined effects of copper, desiccation, and frost on the viability of earthworm cocoons. *Environ Toxicol Chem* 17:897–901.
3. Hanazato T, Dodson SI. 1995. Synergistic effects of low oxygen concentration, predator kairomone, and a pesticide on the cladoceran *Daphnia pulex*. *Limnol Oceanogr* 40:700–709.
4. Koh HL, Hallam TG, Lee Hooi L. 1997. Combined effects of environmental and chemical stressors on a model *Daphnia* population. *Ecol Model* 103:19–32.
5. Williamson CE. 1995. What role does UV-B radiation play in freshwater ecosystems? *Limnol Oceanogr* 40:386–392.
6. Worrest RC, Van Dyke H, Thomson BE. 1978. Impact of enhanced simulated solar ultraviolet radiation upon a marine community. *Photochem Photobiol* 27:471–478.
7. Karentz D, Lutze LH. 1990. Evaluation of biologically harmful ultraviolet radiation in Antarctica with a biological dosimeter designed for aquatic environments. *Limnol Oceanogr* 35:549–561.
8. Oris JT, Giesy JP, Allred PM. 1984. Photoinduced toxicity of anthracene in aquatic organisms: An environmental perspective. In Veziroroglu, TN, ed, *In The Biosphere: Problems and Solutions*, Elsevier, Amsterdam, pp 639–658.
9. Costantini ML, Fazi S, Rossi L. 1996. Size distribution of the amphipod *Paramoera walkeri* (Stebbing) along a depth gradient in Antarctica. *Hydrobiologia* 337:107–112.
10. Sagar PM. 1980. Life Cycle and Growth of the Antarctic Gammarid Amphipod *Paramoera walkeri* (Stebbing, 1906). *J R Soc N Z* 10:259–270.
11. Rakusa-Suszczewski S. 1972. The biology of *Paramoera walkeri* Steb. (amphipoda) and the antarctic sub-fast ice community. *Polar Arch Hydrobiol* 19:11–36.
12. Duquesne S, Riddle M, Schulz R, Liess M. 2000. Effects of contaminants in the Antarctic environment—Potential of the gammarid amphipod crustacean *Paramorea walkeri* as a biological indicator for Antarctic ecosystems based on toxicity and bioaccumulation of copper and cadmium. *Aquat Toxicol* 49:131–143.
13. Liess M. 1997. Fate and ecotoxicological effect of the contaminants of Thala Valley tip site, Casey, Antarctica. ANTDIV 2228. Australian Antarctic Division, Hobart, Tasmania, Australia.
14. Prause AR, Scourfield MWJ, Bodeker GE, Diab RD. 1999. Surface UV-B irradiance and total column ozone above SANAE, Antarctica. *S Afr J Sci* 95:26–29.
15. Begon M, Harper JL, Townsend CR. 1990. *Ecology—Individuals, Populations, Communities*. Blackwell Scientific, Oxford, UK.
16. Ritterhoff J, Zauke GP. 1997. Evaluation of trace metal toxicokinetics in Greenland Sea copepod and amphipod collectives from semi-static experiments on board ship. *Polar Biol* 17:242–250.

17. Preston BL, Snell TW, Kneisel R. 1999. UV-B exposure increases acute toxicity of pentachlorophenol and mercury to the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Environ Pollut* 106:23–31.
18. Bowling JW, Leversee GJ, Landrum PF, Giesy JP. 1983. Acute mortality of anthracene-contaminated fish exposed to sunlight. *Aquat Toxicol* 3:79–90.
19. Nikkilä A, Penttinen S, Kukkonen JVK. 1999. UV-B-induced acute toxicity of pyrene to the waterflea *Daphnia magna* in natural freshwaters. *Ecotoxicol Environ Saf* 44:271–279.
20. Gimeno L, Ferrando MD, Sanchez S, Gimeno LO, Andreu E. 1995. Pesticide effects on eel metabolism. *Ecotoxicol Environ Saf* 31:153–157.
21. Baturó W, Lagadic L, Caquet T. 1995. Growth, fecundity and glycogen utilization in *Lymnaea palustris* exposed to atrazine and hexachlorobenzene in freshwater mesocosms. *Environ Toxicol Chem* 14:503–511.
22. Edwards HM. 1991. Malathion induced changes in the carbohydrate metabolism of freshwater prawn, *Macrobrachium lamarrei*. *Biol Membr* 17:111–115.
23. Maltby L. 1992. The use of the physiological energetics of *Gammarus pulex* to assess toxicity—A study using artificial streams. *Environ Toxicol Chem* 11:79–85.
24. Tan K-H. 1981. Antifeeding effect of cypermethrin and permethrin at sub-lethal levels against *Pieris brassicae* larvae. *Pestic Sci* 12:619–626.
25. Maltby L, Crane M. 1994. Responses of *Gammarus pulex* (Amphipoda, Crustacea) to metalliferous effluents—Identification of toxic components and the importance of interpopulation variation. *Environ Pollut* 84:45–52.
26. Rodríguez EM, Monserrat JM. 1991. Acute and chronic effects of parathion and 2,4 D on the oxygen consumption of *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachiura). *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam* 41:201–210.
27. Hose JE, Puffer HW. 1984. Oxygen consumption rates of grunion (*Leuresthes tenuis*) embryos exposed to the petroleum hydrocarbon, benzo(a)pyrene. *Environ Res* 35:413–420.
28. Zellmer ID. 1996. The impact of food quantity on UV-B tolerance and recovery from UV-B damage in *Daphnia pulex*. *Hydrobiologia* 319:87–92.
29. Regoli F, Principato GB, Bertoli E, Nigro M, Orlando E. 1997. Biochemical characterization of the antioxidant system in the scallop *Adamussium colbecki*, a sentinel organism for monitoring the Antarctic environment. *Polar Biol* 17:251–258.
30. Sundin GW, Jacobs JL. 1999. Ultraviolet radiation (UVR) sensitivity analysis and UVR survival strategies of a bacterial community from the phyllosphere of field-grown peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Microb Ecol* 38:27–38.
31. Lenci F, Ceccucci G, Ghetti F, Gioffre D, Sgarbossa A. 1997. Sensory perception and transduction of UV-B radiation by the ciliate *Blepharisma japonicum*. *Biochim Biophys Acta* 1336:23–27.
32. Van De Mortel TF, Buttemer WA. 1998. Avoidance of ultraviolet-B radiation in frogs and tadpoles of the species *Litoria aurea*, *L. dentata* and *L. peronii*. *Proc Linn Soc N S W* 119:173–179.

Scoring approach based on fish biomarkers applied to French river monitoring

NADIA AARAB, OLIVIER CHAMPEAU, PASCAL MORA,
MICHÈLE DAUBEZE, PHILIPPE GARRIGUES and
JEAN-FRANÇOIS NARBONNE*

Laboratoire de Physico-Toxicochimie des Systèmes Naturels (LPTC), UMR 5472 CNRS,
Université Bordeaux I, F-33405 Talence Cedex, France

Received 8 January 2004, revised form accepted 27 September 2004

The aim was to apply a multimarker scoring approach as complementary to freshwater monitoring programmes carried out by the Water Agency Adour Garonne. Fish (chub, barbel and trout) were collected in 11 sites in rivers in south-west France. Five biomarkers of response were measured either in muscle or brain for acetylcholinesterase (AChE) and in liver for glutathione *S*-transferase, catalase and 7-ethoxyresorufine *O*-deethylase. As a result of multivariate analysis, sites were clearly discriminated mainly by 7-ethoxyresorufine *O*-deethylase and acetylcholinesterase activities. According to the scoring approach, a multimarker pollution index was calculated for each sampling site as the sum of the response index of the five measured biomarkers (pollution index). Sorting was established by ranging the sites from lightly to highly contaminated locations.

Keywords: exposure biomarkers, fish, freshwater, scoring approach, pollution index.

Introduction

Thousands of chemical pollutants such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), heavy metals and pesticides have been produced and released into the environment.

Pollution monitoring programmes were developed in the early 1950s (Mussel watch in the USA, the French Survey Network in France RNO) based on chemical analysis. In the 1980s, measurement of biochemical parameters at molecular or cellular were proposed as sensitive 'early warning' tools for biological effects measurement in environmental quality assessment. The selected biomarkers should indicate: that the organism has been exposed to pollutant (biomarkers of exposure) and/or the magnitude of the toxic effects (biomarkers of effect or biomarkers of stress). Biomarkers are then defined as short-term indicators of long-term biological effects (McCarthy and Shugart 1990).

Biomarkers were selected among four clusters of early molecular mechanisms of action of contaminants as: phases I and II of drug metabolism, oxidative stress and neurotoxicity. Glutathione *S*-transferase (GST) and catalase (CAT) activities were modulated by metal or organic contaminants both under field and laboratory conditions (Pellerin-Massicotte 1994, Prahash and Rao 1995, Regoli and Principato 1995). Cholinesterase activities appeared as biomarkers of exposure for some

* Corresponding author: Jean-François Narbonne, Laboratoire de Physico-Toxicochimie des Systèmes Naturels (LPTC), UMR 5472 CNRS, Université Bordeaux I, F-33405 Talence Cedex, France; e-mail: jf.narbonne@lptc.u-bordeaux1.fr

pesticides and other pollutants on wildlife (Bocquene *et al.* 1990, Najimi *et al.* 1997). A multimarker study maybe useful to evaluate the various responses to natural or anthropogenic changes. The practical approach, carried out by the official agencies in charge of environmental monitoring, is to establish indexes of environmental quality taken into account chemical or biological criteria, in order to classify the sites being monitored in a scale from 'clean' to 'highly polluted'. In theory, any organism may be of use in a biomonitoring study. The abundance of potential test organisms should be considered, especially for river fish, commonly used as sentinel organisms for the detection of environmental pollution in freshwater. In this case, the distribution of fish species along the river is a major problem for sentinel species availability. Fish are collected by electric fishing, minimizing the initial stress, but the mobility and movement patterns of the test organism will also affect biomarker responses. The exposure levels of fishes to persistent contaminants are in part related to their level in a food chain (BAFs, i.e. bioaccumulation factors). The aim of this study is to evaluate the biomarker responses in fish collected during the FISH BIO programme.

Materials and methods

Animals

Three omnivorous species were selected:

- Barbel (*Barbus barbus*) is the largest cyprinide in Europe. It is a strictly riverine fish (Huet 1949) living in rivers with fast flow, stony, gravely bottom and well-oxygenated water. The barbel distribution extends over the major part of Western Europe (the southern most extension limited to the basins of the Rhône and the Danube). Relatively sedentary apart from the spawning period, the barbel can move considerably (10 km) during reproduction period (Baras 1992).
- Chub (*Leuciscus cephalus*) is widely present in all the French rivers. Except for Scandinavia and islands in the Mediterranean Sea (Phillipart 1987), the Chub inhabits the whole of Europe, living in fresh as well as brackish waters, such as the Baltic Sea. Despite capability for adaptation to all water types, the chub has a marked preference for flowing water with a hard bed.
- Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) are know to colonize rivers, lakes and the sea. This species comes from in the west coast of the USA (Rocky Mountains) and was largely introduced during the 19th century all over Europe and specially in Western Europe where trout farming is strongly developed.

Sample collection and preparation

The three studied fish species were collected from 11 sites located in five rivers: Seudre, Dordogne, Garonne, Tarn and Gave de Pau (figure 2). These sites were selected according to previous studies conducted by the Adour-Garonne Water Agency. Pareloup lake is considered as a reference site. Fishes were sampled in late summertime. These sampling were carried out by electrofishing, involving a temporary paralysis of fish. The sampled animals were weighted and lengthened before being sacrificed. Animals were sorted according to the sex during dissection. Sex determination was made by examination of the colour and size of the gonads. Liver, bile, brain and muscle were taken out systematically. Bile was collected only when the size of the individual allowed removal. Tissues and organs were kept on dry ice for further analysis.

Preparation of subcellular fractions

All samples were homogenized at 4 C in 100 mM phosphate buffer, pH 7.4 (1/3 w/v) for 1 min using a Potter-Elvehjem, followed by centrifugation at 9000g for 30 min. Supernatants consisting of the sub-mitochondrial fractions (S9) were collected and stored at -80 C until use.

Bile was sampled in vials and then frozen in liquid nitrogen as pure bile without the gall bladder. For small bile volumes (<30 µl), an initial dilution was made at the time of sampling.

Biochemical assays

Enzymatic activities were measured with a dual-beam temperature-controlled Kontron Uvikon 932 spectrofluorimeter for AChE, GST and catalase activities. EROD activities and proteins concentrations were measured on a microplate-reader (BIOTEC FL600).

Assays were run in triplicate for each individual. AChE, EROD, GST and CAT and *in vitro* activities were measured in the post-mitochondrial fraction (S9) by using as substrates acetylthiocholine (Ellman *et al.* 1961), ethoxyresorufine (Burke and Mayer 1974), 1-chloro-2-4-dinitrobenzene (Habig *et al.* 1974) and oxygen peroxide (Clairborne 1985), and were used as described (Michel *et al.* 1993a, Mora *et al.* 1999, Vidal *et al.* 2001).

Protein concentrations were determined by the method of Bradford (1976) with bovine serum albumin as standard.

The measurement of PAH metabolites in fish bile were performed by direct fluorescence measurement (FF/SFS), followed by analysis in high-performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection (HPLC-F) (Van der Oost *et al.* 1997, Aas *et al.* 2001).

Statistical analyses

Biomarkers data were analysed by carrying out ANOVA and Tukey tests. Discriminant analyses (DA) allowed the separation of the different sites using factor or discriminating functions as linear combinations of the original variables (Narbonne *et al.* 1999). In order to select the biomarkers with the most influence in distinguishing among site responses, a discriminatory power was calculated by ranking analysis as follows:

$$DP_i = \sum R_1 V_1 + \frac{\sum R_2 V_2}{2} + \frac{\sum R_n V_i}{n}$$

where i is the biomarker, n is the number of the root, $R_n V_i$ is the rank number of the discriminatory variable for biomarker i and root n .

Discriminatory patterns were presented using two-dimensional graphs of the first two roots covering the largest fraction of variance. Data were analysed by using the Statistica 6.0 computer software package (Statsoft, Inc., US Headquarters, Tulsa, USA).

Pollution index

All the studied biomarkers were gathered in a global index in order to give a relative idea of the pollution level undergone by the animals. The multimarker pollution index (MPI) for each site was calculated as follows:

$$MPI_i = \sum_{j=1} BPI_j$$

where i is site, j is the biomarker and BPI is the biomarker pollution index from the table of conversion (table 1) for individual mean (X_j), related to discriminatory factor (DF) of the measure:

$$DF = (X_{\max} - X_{\min} + CI)/CI.$$

where X_{\max} is the maximum mean, X_{\min} is the minimum mean and CI is the confidence interval given by Tukey's test.

Finally, a pollution scale was established including five levels (from lightly to highly contaminated). The index level was then converted into colours (red, orange, yellow, green and blue from the highest to the lowest pollution effect) to map pollution levels.

Table 1. Index given for each biomarker response according to their rank in a scale related to the discriminatory factor.

Number of levels	Discriminatory factors				
	1	2	3	4	5
Index of response	4	10			
	3	6	12		
	2	4	7	12	
	1	2	4	8	14

The MPI classification scale from 1 to 5 (Narbonne *et al.* 1999) was first applied in European BIOMAR Programme.

The global biomarker index of each site investigated was calculated and converted to a pollution score level as described (Narbonne *et al.* 1999).

Results

Acetylcholinesterase activity in muscle and brain

For chub, the cholinesterase activity measured in muscle was significantly higher in animals from Le Fleix (75%) and from Tauriac (40%) compared with fish sampled in Pareloup. For barbel, AChE levels were lower at Bourret compared with Pareloup. Brain AChE activity measured in chub was lower in La Garde (-75%) than in Pareloup. No significant activity was observed for barbel and trout (table 2).

EROD activity

The three species show very different EROD activity from control site. Trout shows an activity 2.5 times higher than barbel and 6.5 times higher than chub. For chub, the activities found in La Garde and Lahontan were significantly higher (740 and 565%, respectively) compared with Pareloup (table 2).

For barbel, the highest activities were found in individuals sampled in Bourret and Rabastens. EROD activity measured in trout samples was significantly higher in Montespan than in other sites (table 2).

Catalase activity

Statistical tests show significant differences between the control site of Pareloup and St-André de Lidon (63%) for chub. Barbel, sampled in Rabastens, also showed a significant difference (75%) with the two other sites. No significant differences were observed for trout (table 2).

Glutathione S-transferase activity

Only barbel sampled on Bourret revealed a significant difference (167%) compared with Pareloup (table 2). Interestingly, the catalase activities were quite different in the three species sampled at Pareloup.

Analysis of fish from Lahontan demonstrated a clear presence of metabolites of naphthalene and pyrene compared with Pareloup. Moreover, a significant difference was observed in Millau for naphthalene metabolites compared with pyrene and benzo(a)pyrene metabolites (table 3).

Discriminant analysis

Given all the biochemical parameters investigated in the present study, EROD and AChE were the best studied biomarkers to differentiate between the sampled sites (table 4). This finding was particularly true with respect to results for chub and barbel. In trout, EROD and GST were the best discriminant biomarkers.

For all analyses, the two main roots for discrimination between sites were EROD and AChE. For chub, sites can be ranged from Pareloup, St-André de

Table 2. Results of biomarker measurements for each site studied during the FISHBIO programme.

Sites	AChE activity in muscle ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein)	AChE activity in brain ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein)	CAT activity ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein)	EROD activity ($\text{pmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein)	GST activity ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein)
Chub					
Parceloup	0.119 \pm 0.02	209.73 \pm 37.2	1013.42 \pm 254	27.43 \pm 19.02	1.61 \pm 0.36
St-André de Lidon	0.148 \pm 0.028	214.04 \pm 23.76	1602.77 \pm 493.7*	40.38 \pm 14.16	1.44 \pm 0.47
Le Fleix	0.205 \pm 0.04*	199.53 \pm 37.6	804.48 \pm 290.8	103.78 \pm 42.23	1.37 \pm 0.29
La Garde	0.15 \pm 0.038	155.35 \pm 9.5*	980.50 \pm 267.6	199.39 \pm 145.5*	1.77 \pm 0.28
Lahontan	0.145 \pm 0.025	180.49 \pm 49.4	1031.41 \pm 300.9	152.66 \pm 70.2*	1.68 \pm 0.58
Tauriac	0.174 \pm 0.027*	205.22 \pm 26.9	1235.41 \pm 687.05	60.93 \pm 39.87	1.4 \pm 0.57
Barbel					
Parceloup	0.174 \pm 0.042	149.52 \pm 25.6	355.30 \pm 164.65	72.07 \pm 33.88	1.12 \pm 0.38
Bourret	0.122 \pm 0.026*	159.95 \pm 29.23	462.64 \pm 153.6	218.5 \pm 78.28*	1.88 \pm 0.64*
Rabastens	0.21 \pm 0.039	162.62 \pm 30.67	601.36 \pm 294.18*	194.64 \pm 122.37*	1.45 \pm 0.67
Trout					
Parceloup	0.159 \pm 0.04	106.33 \pm 49	575.84 \pm 263	176.64 \pm 144.83	1.05 \pm 0.43
Clarac	0.146 \pm 0.03	77.14 \pm 15.7	694.31 \pm 207	161.4 \pm 129.12	0.94 \pm 0.33
Millau	0.151 \pm 0.04	84.96 \pm 18.5	774.76 \pm 276	158.73 \pm 126.01	1.13 \pm 0.41
Montespan	0.128 \pm 0.01	118.72 \pm 67.2	794.84 \pm 161.5	458.16 \pm 200.57*	1.4 \pm 0.53

Values are means \pm SD (standard deviations, $n = 20$).

*Significantly different from reference site.

Table 3. PAH metabolites measured in bile from fish collected in sampled sites.

Sites	Naphthalene, FF290/335	Pyrene, FF341/383	Benzo(a)pyrene, FF380/430
Chub			
Pareloup	3287 ± 898	268 ± 86	79 ± 28
St-André de Lidon	4615 ± 5512	610 ± 852*	356 ± 306*
Le Fleix	2675 ± 2590	167 ± 138	58 ± 70
La Garde	2646 ± 1778	224 ± 145	79 ± 76
Lahontan	5826 ± 1876*	3187 ± 1400*	251 ± 153*
Tauriac	3136 ± 1640	4203 ± 383	147 ± 137*
Barbel			
Bourret	3186 ± 1437	477 ± 260	120 ± 107
Trout			
Pareloup	8581 ± 5130	790 ± 514	412 ± 309
Clarac	1816 ± 732*	280 ± 139*	144 ± 31
Millau	5373 ± 4461	578 ± 351	482 ± 447
Montespan	4670 ± 2659*	621 ± 461	138 ± 120

FF, fixed wavelength fluorescence.

For naphthalene: (μg naphthalene equivalents ml^{-1} bile); for pyrene: (μg pyrene equivalents ml^{-1} bile); and for benzo(a)pyrene: (μg benzo(a)pyrene equivalents ml^{-1} bile).

Values are means \pm SD (standard deviations, $n = 20$).

*Significantly different from reference site ($p < 0.05$).

Lidon to La Garde. For trout, Montespan is clearly discriminated as a highly contaminated site among the others. For barbel, Pareloup is discriminated from Rabastens on the EROD basis and from Bourret on the AChE in muscle basis (figure 1).

Index calculation

The results of multimarker measurement expressed as MPI and BPI for each site are presented in figure 2. MPI is converted in five pollution levels associated with a colour from blue to red.

Pollution gradient was clearly indicated by mapping MPIs. Upstream sites (Clarac and Millau) exhibited a blue index; intermediate sites exhibited a green index (Montespan, Rabastens Tauriac, Le Fleix); and downstream sites (St-André de Lidon and Lahontan) exhibited a yellow or an orange index. Moreover, La Garde and Bourret areas exhibited orange and yellow index, respectively. The

Table 4. Ranking of the biomarker measured in the present study as listed according to their discriminant power.

Chub		Barbel		Trout	
Biomarkers	DP	Biomarkers	DP	Biomarkers	DP
EROD	5.70	AChEm	4.27	EROD	5.17
AChEm	7.17	EROD	6.71	GST	6.17
CAT	7.83	GST	9.15	CAT	7.17
GST	8.17	CAT	9.15	AChEb	7.67
AChEb	9.17	AChEb	9.15	AChEm	9.17

DP, discriminant power.

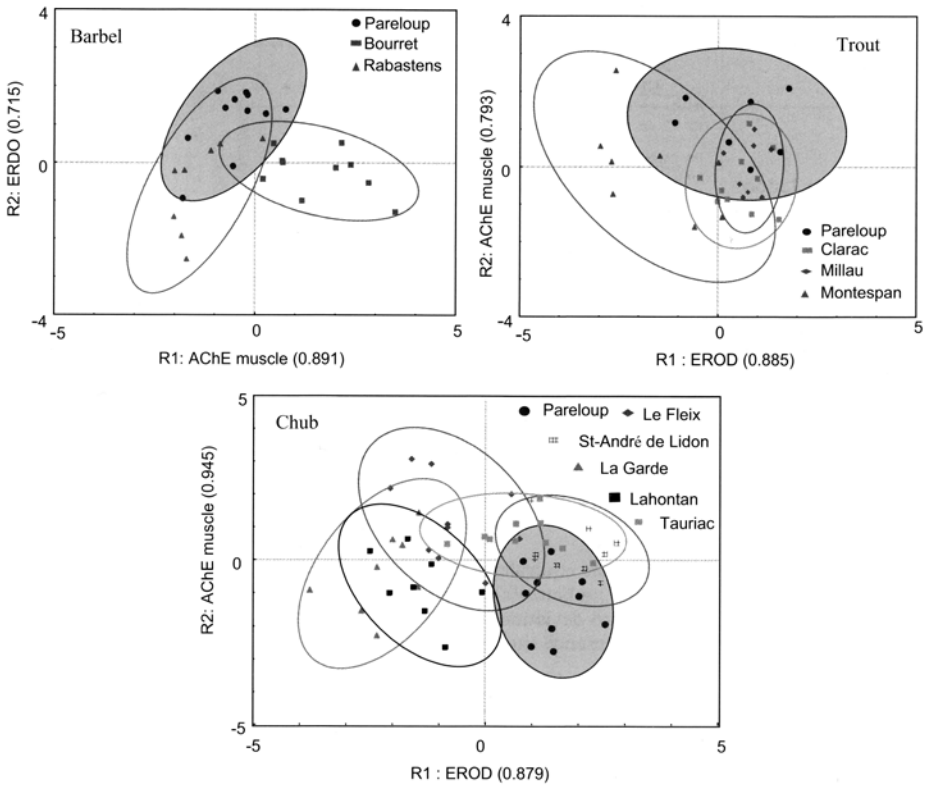


Figure 1. Discriminant analysis for barbel, trout and chub, respectively, sampling sites.

indices in Pareloup lake (selected as the reference site) were blue for trout, barbel and chub. The main contaminants, usually measured by the Water Agency in the sampled sites (Mora *et al.* 2003), indicated pollution by PAHs in Lahontan (there is chemical industry upstream in Lacq), contamination by heavy metals (specially cadmium) in the Tarn (Rabastens, La Garde), and high levels of pesticides in Bourret and St-André de Lidon. The gradient of PCB contamination was found in the Garonne from Clarac to Bourret.

Discussion

Enzymes activities

AChE is involved in the deactivation of acetylcholine at nerves ending, preventing continuous synaptic transmission, which is vital for normal functioning of sensory and neuromuscular systems. Many pesticides are effective AChE inhibitors and the inhibition of this enzyme has been used to assess the nature and the extent of exposure of wildlife to agriculture and forestry sprays. The effects observed in Bourret may indicate the presence of pesticides and/or heavy metals (Olson and Christensen 1980) in water. Pesticides used near the sampled sites are highly variable within the year and a better knowledge of agriculture and forestry practices will be useful to support biochemical data. For Le Fleix and Tauriac, a

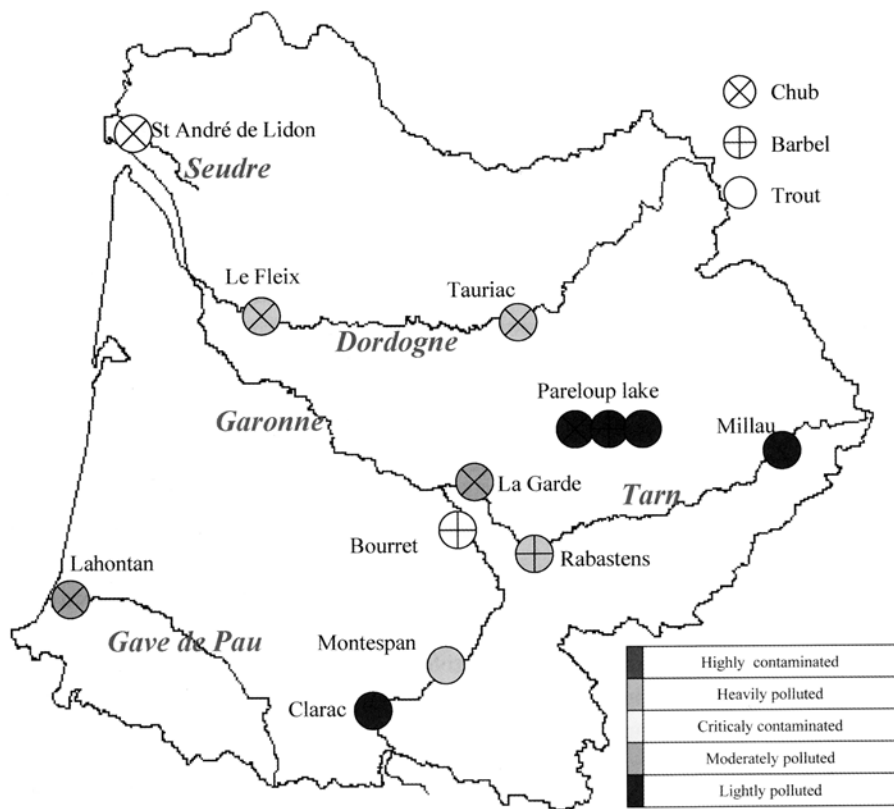


Figure 2. Biomarkers contribution for each station in the Dordogne–Garonne basin, South West France.

higher AChE activity in muscle was found compared with Pareloup, supposedly a less polluted site (Mora *et al.* 2003). Indeed, the temperature of the environment may also have a significant effect on the AChE activities (Bocquene *et al.* 1990).

The induction of CYP1A in fish, following exposure to certain classes of organic contaminants, was the basis of the use of the cytochrome P450 system as biomarker in pollution monitoring (Payne 1976). Hepatic EROD activity from all fish was significantly correlated ($p < 0.05$) to PCB body burden (estimated by concentration in the muscle). A number of field studies have shown a significant linear relationships between EROD induction and PCBs bioaccumulation in fish (Flammarion *et al.* 1998, Monod *et al.* 1988). Indeed, measurement of EROD activity in fish is a well-established *in vivo* biomarker of exposure to several planar halogenated/polycyclic aromatic hydrocarbons and many structurally related compounds (Lam and Gray 2003). However, some EROD values appeared to be lower especially in chub from Le Fleix. Such assumed inhibition of EROD has already been found on the chub in the presence of heavy metals (Flammarion *et al.* 2002).

Correlation between EROD activities in fish and concentration of potential EROD inducers have been reported (Garrigues *et al.* 1990, Narbonne *et al.* 1991) but, however, in certain *in situ* conditions inhibition of EROD activities by other

contaminations has been observed (Bucheli and Fent 1995, Bruschweiler *et al.* 1996, Klumpp *et al.* 2002). However, a direct correlation between single contaminant and EROD activity can hardly be expected in field situations because of generalized multiple contamination. Such an effect may derive from the influence of another natural factor that has not yet been taken into account in this study (Flammarion *et al.* 2002). However, it is known that many non-pollution variables may have an additional impact on the various enzyme systems, and may thus interfere with biomarker responses. Other confounding factors have to be taken into account such as health, condition, sex, age, nutritional status, metabolic activity, migratory behaviour, reproductive and developmental status, population density (Altenburger *et al.* 2003) and seasonal variations. The modulation of EROD during the year for the eelpout (*Zoarces viviparus*) shows highest activity in February–March and it decreased afterwards (Ronisz *et al.* 1999).

Despite its popularity and apparent success, the mixed-function oxidase (MFO) system itself is relatively non-specific. Many organisms possess this detoxification enzyme complex, which can be induced as a response to a wide variety of natural and xenobiotic compounds. Thus, MFO concentration in field collected samples are often difficult to interpret, especially in localities where no point sources exist (Lam and Gray 2003). Exposure to environmental contaminants involves many complex processes ending by oxidative stress, which can be evaluated by antioxidant enzyme activity such as catalase. The two responses observed in the barbel from Rabastens and the chub from St-André de Lidon are likely due to a higher presence of heavy metals than in the other sampling sites from each species (data not shown).

Elevated GST activity was measured in barbel found in Bourret. This site appeared to be contaminated by PCBs (Mora *et al.* 2003). Laboratory and field studies reported a strong GST induction in fish and mussels exposed to PCBs commercial mixtures or pure congener (Michel *et al.* 1993).

The major problem we could face in an *in situ* approach for continental contamination detection is the large number of compounds that could reach such ecosystem and could be able to interfere.

The pyrene-type bile metabolites are correlated to total PAHs and pyrene in liver and muscle ($p < 0.01$) (Mora *et al.* 2003). The particular pyrene-type bile metabolites were demonstrated to be relevant as an exposure marker to PAHs in fish (Aas *et al.* 2001).

Discriminant analysis

Discriminant analysis (DA) has already proven to be a very useful method for classifying the pollution status of different sites (Adams *et al.* 1994, 1996). It is performed in order to maximize the inter-site variance, thus helping to characterize the differences between the various sites. Recent examples of the use of DA on environmental quality data concerned the characterization of different stations along French rivers (Persat *et al.* 1985), in a Norwegian fjord (Beyer 1996) and in Amsterdam inland water sites (Van der Oost *et al.* 1997), which were based on the results of biomarker of exposure in fish provided an efficient tool for the statistical to discrimination between sampling sites. EROD appeared as the main discrimi-

downstream was mapped by using a colour scale, thus providing useful information for risk management.

Acknowledgements

The Water Agency Adour–Garonne is acknowledged for financial support of the FISH BIO programme (2001–02). The authors thank the group Total for computerization of the pollution index, Pascal Mora for technical assistance and Dr Daniel Ribera for helpful information and discussion.

References

- AAS, E., BEYER, J., JONSSON, G., REICHERT, W. L. and ANDERSEN, O. K. 2001, Evidence of uptake, biotransformation and DNA binding of polyaromatic hydrocarbons in Atlantic cod and corkwing wrasse caught in the vicinity of an aluminium works. *Marine Environmental Research*, **52**, 213–229.
- ADAMS, S. M., HAM, K. D. and BEAUCHAP, J. J. 1994, Application of canonical variate analysis in the evaluation and presentation of multivariate biological response data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **13**, 1673–1683.
- ADAMS, S. M., HAM, K. D., GREELEY, M. S., LEHEW, R. F., HINTON, D. E. and SAYLOR, C. F. 1996, Downstream gradients in bioindicators responses: point source contaminant effect on fish health. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **53**, 39–49.
- ALTENBURGER, R., SEGNER, H. and VAN DER OOST, R. 2003, Biomarkers and PAHs – prospects for the assessment of exposure and effects in aquatic systems. In *PAHs: An Ecotoxicological Perspective*, edited by Peter, E. T. (Douben Unilever Colworth R&D, Safety and Environmental Assurance Center), pp. 298–328.
- BARAS, E. 1992, Contribution à l'étude des stratégies d'occupation du temps et de l'espace chez un poisson téléostéen dulcicole, le barbeau fluviatile, *Barbus barbus* (L.). Etude par ratio dépistage, pêche à l'électrécité et observation directe. Doctorate thesis, Université de Liège.
- BEHRENS, A. and SEGNER, H. 2001, Hepatic biotransformation enzymes of fish exposed to no point source pollution in small streams. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, **8**, 281–297.
- BELIAEFF, B. and BURGEOT, T. 2002, Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **21**, 1316–1322.
- BEYER, J. 1996, Fish biomarkers in marine pollution monitoring: evaluation and validation in laboratory and fields studies. Doctorate thesis, University of Bergen.
- BOCQUENE, G., GALGANI, F. and TRUQUET, P. 1990, Characterization and assay for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. *Marine Environmental Research*, **30**, 75–89.
- BRADFORD, M. 1976, A rapid and sensitive assay of protein utilizing the principle of dye binding. *Analytical Biochemistry*, **772**, 248–264.
- BRUSCHWEILER, B. J., WURGLER, F. E. and FENT, K. 1996, Inhibitory effects of heavy metals on cytochrome P4501A induction in permanent fish hepatoma cells. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **31**, 475–482.
- BUCHHELI, T. D. and FENT, K. 1995, Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Environmental Science and Technology*, **25**, 201–268.
- BURKE, M. D. and MAYER, R. T. 1974, Ethoxyresorufine: direct assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metabolism and Disposition*, **2**, 583–588.
- CHÈVRE, N., GAGNE, F., GAGNON, P. and BLAISE, C. 2003, Application of rough sets analysis to identify polluted aquatic sites based on a battery of biomarkers: a comparison with classical methods. *Chemosphere*, **51**, 13–23.
- CLAIRBORNE, A. 1985, Catalase activity. In *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, edited by Greenwald, R. A. (Boca Raton: CRC Press), pp. 283–284.
- ELLMAN, G. L., COURTNEY, K. D., ANDRES, V. J. and FEATHERSTONE, R. M. 1961, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, **7**, 88–95.
- FLAMMARION, P., MIGEON, B. and GARRIC, J. 1998, Statistical analysis of cyprinids EROD data in a large French watershed. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **40**, 144–153.
- FLAMMARION, P., NOURY, P. and GARRIC, J. 2002, The measurement of cholinesterase activities as a biomarker in chub (*Leuciscus cephalus*): the fish length should not be ignored. *Environmental Pollution*, **120**, 325–330.

- GARRIGUES, P., RAOUX, C., LEMAIRE, P., RIBERA, D., MATHIEU, A., NARBONNE, J. F. and LAFAURIE, M. 1990, *In situ* correlation between polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and PAH metabolizing system activities in mussels and fish in the Mediterranean sea: preliminary results. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **38**, 379–387.
- HABIG, W. H., PABST, M. J. and JAKOBY, W. B. 1974, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, **249**, 7130–7139.
- HANDY, R. D., GALLOWAY, T. S. and DEPLEDGE, M. H. 2003, A proposal for the use of biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology. *Ecotoxicology*, **12**, 331–343.
- HUET, M. 1949, Aperçu des relations entre la pente et les populations piscicoles des eaux courantes. *Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie — Swiss Journal of Hydrology*, **11**, 29–41.
- KLUMPP, D. W., HUMPHREY, C., HUASHENG, H. and TAO, F. 2002, Toxic contaminants and their biological effects in coastal waters of Xiamen, China. II. Biomarkers and embryo malformation rates as indicators of pollution stress in fish. *Marine Pollution Bulletin*, **44**, 761–769.
- LAM, P. K. S. and GRAY, J. S. 2003, The use of biomarkers in environmental biomonitoring programmes. *Marine Pollution Bulletin*, **47**, 182–186.
- MCCARTHY, J.-F. and SHUGART, L. R. 1990, *Biomarkers of Environmental Contamination* (Boca Raton: CRC Press).
- MICHEL, X. R., CASSAND, P. M. and NARBONNE, J. F. 1993a, Activation of benzo[a]pyrene and 2-aminoanthracene to bacteria mutagens by mussel digestive gland postmitochondrial fraction. *Mutation Research*, **301**, 113–119.
- MICHEL, X. R., SUTEAU, P., ROBERTSON, L. W. and NARBONNE, J.-F. 1993b, Effects of benzo(a)pyrene, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl and 2,2,4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl on the xenobiotic-metabolizing enzymes in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Aquatic Toxicology*, **27**, 335–344.
- MONOD, G., DEVAUX, A. and RIVIERE, J. L. 1988, Effects of chemical pollution on the activities of hepatic xenobiotic metabolizing enzymes in fish from the river Rhône. *Science of the Total Environment*, **73**, 189–201.
- MORA, P., AARAB, N., DAUBEZE, M., BUDZINSKI, H. and GARRIGUES P. 2003, *La Contamination Chimique Et Les Biomarqueurs Chez Le Poisson*. Project FISH BIO. Water Agency Adour–Garonne Report.
- MORA, P., FOURNIER, D. and NARBONNE, J. F. 1999, Cholinesterases from the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and *M. edulis* L. from the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* Muller. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, **122**, 353–361.
- NAJMI, S., BOUHAIMI, A., DAUBEZE, M., ZEKHINI, A., PELLERIN-MASSICOTTE, J., NARBONNE, J.-F. and MOUKRIM, A. 1997, Use of acetylcholinesterase in *Perna viridis* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution in Agadir marine bay (South of Morocco). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **58**, 901–908.
- NARBONNE, J. F., GARRIGUES, P., RIBERA, D., RAOUX, C., MATHIEU, A., LEMAIRE, P., SALAUN, J. P. and LAFAURIE, M. 1991, Mixed-function oxygenase enzymes as tools for pollution monitoring: field studies on the French coast of the Mediterranean Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, **100**, 37–42.
- NARBONNE, J.-F., DAUBEZE, M., CLERANDEAU, C. and GARRIGUES, P. 1999, Scale of classification based on biochemical markers in mussels: application to pollution monitoring in European coasts. *Biomarkers*, **4**, 415–424.
- OLSON, D. L. and CHRISTENSEN, G. M. 1980, Effects of water pollutants and other chemicals on fish acetylcholinesterase (*in vitro*). *Environmental Research*, **21**, 327–335.
- PAYNE, J. 1976, Field evaluation of benzopyrene hydroxylase induction as a monitor for marine petroleum pollution. *Science*, **191**, 945–946.
- PELLERIN-MASSICOTTE, J. 1994, Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine bivalves. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, **3**, 101–111.
- PERSAT, H., NELVA, A. and CHESSEL, D. 1985, Approche par l'analyse discriminante sur les variables qualitatives d'un milieu lotique: le haut Rhône français. *Acta Oecologica. Oecologica Generalis*, **6**, 356–381.
- PHILLIPART, J. C. 1987, Démographie, conservation et restauration du barbeau fluviatile, *Barbus barbus* (L.) dans la Meuse et ses affluents. Quinze années de recherches. *Annales de la Société Royale de Zoologie Belgique*, **117**, 49–62.
- PRAHASH, N. T. and RAO, K. S. J. 1995, Modulations in antioxidant enzymes in different tissues of marine bivalve *Perna viridis* during heavy metal exposure. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **146**, 107–113.
- REGOLI, F. and PRINCIPATO, G. 1995, Glutathione, glutathione-dependant and antioxidant enzymes in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metal under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquatic Toxicology*, **31**, 143–164.
- RONISZ, D., LARSSON, D. G. and FORLIN, L. 1999, Seasonal variations in the activities of selected hepatic biotransformation and antioxidant enzymes in eelpout (*Zoarces viviparus*). *Comparative Biochemistry and Physiology C*, **124**, 271–279.

- VAN DER OOST, R., VINDIMIAN, R., VAN DEN BRINK, E., SATUMALAY, P. J., HEIDA, K. and VERMEULIN, H. 1997, Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*): statistical analyses of relationships between contaminant exposure and biomarkers. *Aquatic Toxicology*, **39**, 45–75.
- VIDAL, M. L., BASSERES, A. and NARBONNE, J. F. 2001, Interest of a multibiomarker approach in the assessment of freshwater ecosystem quality: laboratory and field studies. *Water Science Technology*, **44**, 305–312.
- WILSON, J. Y., ADDISON, R. F., MARTENS, D., GORDON, R. and GLICKMAN, B. 2000, Cytochrome P450 1A and related measurements in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus mykiss*) from the Fraser river. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **55**, 405–413.

Scale of classification based on biochemical markers in mussels: application to pollution monitoring in Mediterranean coasts and temporal trends

J. F. NARBONNE, N. AARAB, C. CLÉRANDÉAU, M. DAUBÈZE,
J. NARBONNE, O. CHAMPEAU, & P. GARRIGUES

Laboratoire de Physico et Toxicochimie des Systèmes Naturels, UPRESA CNRS 5472, Université Bordeaux, Talence, France

Abstract

A battery of biochemical parameters was used to evaluate the response of mussels to a contaminated coastal environment. A multimarker approach was developed, establishing a scale for the classification of the water quality in European coastal sites (BIOMAR European programme). This study allows the evaluation of the temporal trends of this scale when applied to selected sites of European Mediterranean coast (BEEP Biological Effects of Environmental Pollution in Marine Coastal Ecosystems: European programme). Acetylcholinesterase activity (AChE) is highly sensitive to organophosphorus and carbamate insecticides and, to some extent, also to heavy metals. Catalase activity (CAT) and lipid oxidation (evaluated as malonedialdehyde) are markers of oxidative stress, glutathione S-transferase (GST) activity is related to conjugation of organic compounds and benzo(a)pyrene hydroxylase activity (BPH) is a marker of effect of certain planar organic compounds (e.g. polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs). These parameters were measured either in gills (AChE, GST) or digestive gland (BPH, GST, CAT, MDA). For each biomarker, a discriminatory factor was calculated (maximum variation range/confidence interval) and a response index was allocated. For each site, a Multimarker Pollution Index (MPI) was calculated as the sum of the response index of each of the five more discriminating biomarkers. As the result of our calculation method, the quality of the coastal environment at each site can be classified according to a five levels scale. Samples collected for five cruises in May 2001, 2002, 2003, and September 2001 and 2002 showed MPI evolutions. The results show that water quality can be classified from class 1 (clean areas in some sites of France, Italy and Spain) to class 4 (high pollution in main harbours). Results of the use of the biomarker scale in WP3 (Work Package Concernant Biomonitoring Programmes in Mediterranean Sea) during the BEEP programme make a strong contribution to the establishment of standardized strategies and methods for internationally agreed protocols for biomarker-based monitoring programmes. In comparison with scale pollution methodology used in the BIOMAR programme, the main contribution of BEEP was (1) to select from discriminatory analysis the biomarkers to be included in calculation of scale pollution; (2) to improve the use of the biomarker index in order to identify the main contaminants by analysis of individual contributions to the MPI; and (3) to apply methodology for temporal trends at sampled sites.

Keywords: *Molecular biomarkers, Mytilus galloprovincialis, benzo(a)pyrene hydroxylase, glutathione S-transferase, catalase, malonedialdehyde, acetyl cholinesterase, Mediterranean Sea*

(Received 28 September 2004; accepted 27 January 2005)

Correspondence: J. F. Narbonne, Toxicologie Biochimique, LPTC CNRS 5472, Avenue des Facultés, F-33405 Talence Cedex, France. E-mail: jf.narbonne@lptc.u-bordeaux1.fr.

Introduction

Over the past decade, early molecular and cellular biomarkers have been extensively used in pollution monitoring in aquatic environments (McCarthy and Shugart 1990, Huggett et al. 1992). Biomarkers were selected among early molecular events occurring in the toxicological mechanisms of major contaminants (PAHs, PCBs, heavy metals, pesticides, etc.) and are potentially useful tools for detecting either exposure to, or effects of, chemicals. Benzo(a)pyrene hydroxylase (BPH) activity was used in a number of field studies in mussels and some correlations were found with PAH pollution (Suteau et al. 1988, Garrigues et al. 1990, Narbonne et al. 1991, Michel et al. 1994). Lipid peroxidation (malonedialdehyde, MDA formation), glutathione S-transferase (GST) and catalase (CAT) activities were found to be modulated by metal or organic contaminants both under field and laboratory exposure (Pellerin-Massicotte 1994, Prahash and Rao 1995, Regoli and Principato 1995). Recently, cholinesterase activities have appeared as biomarkers of exposure for some pesticides and other pollutants on wildlife (Boquene et al. 1990, Najimi et al. 1997). These data can be useful to scientists to evaluate the specificity of the responses to natural or anthropogenic changes, but it is very difficult for the environmental manager to interpret increasing or decreasing changes in biomarker data. Except for some examples in limited areas and time (Bayne et al. 1988, McCarthy et al. 1990), the translation of biochemical data into environmental information is limited due to the difficulty to interpret the temporal and spatial extent of biomarker variation. The practical approach carried out by the official agencies in charge of environmental survey is to establish indexes of environmental quality taking into account chemical or biological criteria in order to classify the sites being monitored in a scale from 'clean' to 'highly polluted' (usually four for microbiological criteria, or five levels for chemical criteria). Marine mussels are commonly used as sentinel organisms for the detection of environmental pollution in coastal waters due to their capacity to accumulate several organic and inorganic contaminants (Goldberg et al. 1975, Livingstone 1991). During the BIOMAR European programme (1994–98), the pollution index scale was developed and first applied to the European coast. Work Package 3 (WP3 Concernant Biomonitoring Programmes in Mediterranean Sea) was part of BEEP programme (supported by the European Commission) and aimed to validate the multimarker approach in pollution monitoring of European coastal environments. The aims of this study are to evaluate the temporal trends of this scale applied to selected sites of the European Mediterranean coast. Working sites (identified as clean, intermediate and polluted) were selected on the Italian, French and Spanish coasts based on historical knowledge (chemical and biological data) by participant scientific groups.

Materials and methods

Sample collection and preparation

Mussels (*Mytilus galloprovincialis*) were collected from stations on the European coast by either grab or skin divers (in water depth up to 40 m). Coastal sites from the Mediterranean (France, Italy and Spain) were expected to present a wide variety of contamination patterns, from preserved areas (Aragnon, Porto Fino, Cala Monjoy), intermediate areas (Lavera, Cortiou, Voltri, Fangal, Los Alfaques) to highly polluted harbours on the coast (Fos, Genoa, Barcelona). Five sampling cruises took place in

the same area (May, September 2001, May, September 2002, May 2003). Gills and digestive glands were dissected and immediately stored in liquid nitrogen before analysis.

Biochemical measurements

Biochemical determinations were carried out as described (Labrot et al. 1996). In gills, AChE and GST activities were measured in the post-mitochondrial fraction (S9) by using acetylthiocholine (Ellman et al. 1961) and 1-chloro-2-4-dinitrobenzene (Habig et al. 1974), respectively. In digestive gland, BPH activity was measured in the microsomal fraction (Michel et al. 1994). GST, CAT activities (Clairborne 1985) and MDA were determined in post-mitochondrial fraction (S9). The concentration of endogenous MDA was also measured after reaction with thiobarbituric acid (Buege and Aust 1978). All these data were expressed in relation to protein concentration estimated according to the method of Lowry et al. (1951).

Statistical procedure and indices calculation

An ANOVA analysis was used to determine the statistical significance of the individual biochemical variables among sites. Tukey's test was used to determine the significance for individual variables between sites to determine the integrated response of mussel to the environmental conditions at each sampling site. All the individual biomarkers were considered jointly within a multivariate context using a canonical discriminant analysis procedure (Statistica software 6.0 StatSoft, Inc., 2002 Edn). A variable selection procedure (Adams et al. 1999) was also used to identify and select those variables that contributed most to the discrimination among the integrated biomarker response for each site.

In lieu of a common expression of biomarker results (increased or decreased activity), we developed a simple scoring approach to provide a relative comparison among sites that exhibited multiple biomarker responses. The multimarker pollution index (MPI) for each site was calculated as follows:

$$\text{MPI}_i = \sum_{j=1} \text{BPI}$$

where i is the site, j is the biomarker, BPI is the biomarker pollution index from the table of conversion (Table I) for individual mean (X_i), related to discriminatory factor (DF) of the measure:

$$\text{DF} = (X_{\max} - X_{\min} + \text{CI})/\text{CI}$$

Table I. Index of response for each biomarker according to their rank in a scale based on discriminatory factors.

Number of levels	Discriminatory factors				
	1	2	3	4	5
Index of response	4	10			
	3	6	12		
	2	4	7	12	
	1	2	4	8	14

where X_{\max} is the mean maximum, X_{\min} is the mean minimum and CI is the confidence interval given by Tukey's test.

Finally a pollution scale was established including five levels (from lightly to highly contaminated). The global biomarker index of each site and for each cruise was converted to a pollution level and associated to a colour (red, orange, yellow, green and blue for classes from 5 to 1). These colours were reported on the map of the collected sites in order to visualize easily the temporal changes in effects of pollution.

The MPI classification scale from 1 to 5 (Narbonne et al. 1999) was first applied in European BIOMAR Programme.

Results

Discriminant analysis

As result of discriminant analysis, the individual biomarker variables are shown in Table II. In order to select the biomarkers with the most influence in distinguishing among site responses, a discriminatory power was calculated by ranking analysis (Table III).

Discriminatory power was calculated using:

$$DP_i = \sum R_1 V_1 + \frac{\sum R_2 V_2}{2} + \frac{\sum R_n V_i}{n}$$

where i is the biomarker, n is the number of cruises, r is the root of discrimination and RV_i is the rank number of the discriminatory variable for biomaker i and root r .

The order of importance in term of discriminatory power was GSTg > CATdg > AChEg > BPHdg > GSTdg > MDAdg. Therefore, the first five biomarkers were selected for MPI calculation.

Index calculation

The results of biomarker measurements to built scale are presented in Table IV; the discriminatory factors are presented in Table V; the MPI and BPI are presented in Table VI; and the contribution of each biomarker by station are presented in Figure 1.

The Multimarker Pollution Index (MPI) of each station, for each site for each cruise is converted in five pollution levels (from highly to lightly contaminated) and associate with a colour from blue to red (or a number from 1 to 5) related to the pollution level. These colours are reported in Figure 2, respectively, for French, Italian and Spanish sites in order to visualize easily potential 'hot spots' and the temporal changes in effects of pollution. Supposed 'hot spots' and gradients of contamination were selected by local research groups in Italy, France and Spain. The relationship between biomarker response and environmental characteristics was investigated using the MPI and the profiles of biomarker contributions to the MPI. Moreover, temporal trends may be estimated by MPI seasonal variations related to successive sampling cruises.

In French sites, data from BEEP 1 cruise showed (Figure 2A) that the higher MPI was measured in Cortiou (supposed hot spot), but there was no significant differences between sites in the Gulf of Fos (a supposed gradient). Results of temporal trends showed that the MPI remained high in Cortiou (except in May 2002). The mean MPI

Table II. Individual biomarker variables (canonical roots) measured in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) sampled from the Mediterranean Sea during the BEEP project used for the discriminatory analysis procedure.

	Variable	Root 1	Root 2	Root 3
May 2001 BEEP	AChE g	-0.515	-0.785	0.554
	BPH dg	-0.724	-0.365	0.830
	CAT dg	-0.402	-0.924	-1.793
	MDA dg	-0.277	0.126	0.176
	GST dg	-0.027	2.171	0.427
	GST g	1.948	-0.296	-0.115
September 2001 BEEP	AChE g	-1.804	-0.927	0.875
	BPH dg	0.212	0.556	0.076
	CAT dg	0.447	1.181	-0.588
	MDA dg	0.251	0.062	0.224
	GST dg	-0.568	0.121	-0.905
	GST g	1.334	-0.883	-0.361
May 2002 BEEP	AChE g	-0.119	-0.937	-2.022
	BPH dg	-0.622	0.111	-0.143
	CAT dg	-1.549	0.002	0.740
	MDA dg	1.239	1.091	-0.138
	GST dg	-0.061	1.089	1.609
	GST g	1.180	-1.460	0.219
September 2002 BEEP	AChE g	-1.241	-0.178	0.093
	BPH dg	-0.050	1.094	0.335
	CAT dg	-0.781	-1.474	0.520
	MDA dg	-0.245	0.195	0.173
	GST dg	0.214	0.017	-2.088
	GST g	1.885	0.032	1.148
May 2003 BEEP	AChE g	-0.032	0.626	0.345
	BPH dg	-1.084	-0.105	0.043
	CAT dg	-0.329	0.100	-0.463
	MDA dg	0.238	-0.535	-0.707
	GST dg	-0.020	0.242	0.141
	GST g	-0.214	0.808	-0.495

All biomarker abbreviations are explained in the abstract.

from four cruises was 38. The MPI average from five cruises appeared relatively low in Fos and Lavera (24) with a slight seasonal variation (green or blue). Aragnon exhibited intermediates MPI (mean = 28). Biomarker contribution profiles suggested

Table III. Discriminatory power calculated by ranking analysis of variables for each biomarker of response in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in Table I.

	Root 1						Root 2						Root 3						Discriminatory Power
	B1	B2	B3	B4	B5	Σ	B1	B2	B3	B4	B5	Σ	B1	B2	B3	B4	B5	Σ	
AChE g	5	1	5	2	5	18	3	2	5	5	5	20	5	2	1	5	5	18	34
BPH dg	2	5	5	5	1	18	5	5	5	2	5	22	2	5	5	5	5	22	36
CAT dg	5	5	1	3	5	19	2	1	5	1	5	14	1	5	3	5	5	19	32
MDA dg	5	5	2	5	5	22	5	5	3	5	5	23	5	5	5	5	1	21	41
GST dg	5	5	5	5	5	25	1	5	2	5	5	18	5	1	2	1	5	14	39
GST g	1	2	5	1	5	14	5	3	1	5	1	15	5	5	5	2	5	22	29

Table IV. Results of biomarker measurements in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) for each station at each of the three sites during BEEP cruises in the Mediterranean Sea between 2001 and 2003.

Site	Station	Campaign	AChE activity in g (nmol/mn/mg protein) (mean \pm MCI)	GST activity in g (nmol/mn/mg protein) (mean \pm MCI)	GST activity in dg (nmol/mn/mg protein) (mean \pm MCI)	CAT activity in dg (μ mol/mn/mg protein) (mean \pm MCI)	BPH activity in dg (pmol/mn/mg protein) (mean \pm MCI)	MDA level in dg (nmol/mg protein) (mean \pm SE)
France								
	111 Aragnon	May 2001	52.45 \pm 13.0	405.13 \pm 140.5	267.48 \pm 30.4	67.20 \pm 16.8	96.85 \pm 18.3	0.904 \pm 0.21
	211 Aragnon	September 2001	39.11 \pm 5.3	320.00 \pm 51.4	141.11 \pm 26.6	80.42 \pm 21.9	28.51 \pm 14.9	0.737 \pm 0.39
	311 Aragnon	May 2002	50.30 \pm 7.8	364.76 \pm 64.3	157.67 \pm 26.4	134.07 \pm 15.5	14.67 \pm 8.0	0.127 \pm 0.04
	411 Aragnon	September 2002	88.53 \pm 14.4	450.24 \pm 68.0	92.35 \pm 11.3	59.70 \pm 9.9	38.49 \pm 186	0.288 \pm 0.05
	511 Aragnon	May 2003	20.00 \pm 2.0	391.25 \pm 91.1	305.98 \pm 47.8	125.37 \pm 23.2	nd	2.143 \pm 0.77
	112 Lavera	May 2001	42.51 \pm 13.0	309.83 \pm 140.5	209.37 \pm 30.4	50.86 \pm 16.8	70.02 \pm 18.3	0.993 \pm 0.31
	212 Lavera	September 2001	31.38 \pm 5.3	356.36 \pm 51.4	114.69 \pm 26.6	93.69 \pm 21.9	23.62 \pm 14.9	0.362 \pm 0.24
	312 Lavera	May 2002	40.44 \pm 7.8	221.09 \pm 64.3	104.84 \pm 26.4	92.99 \pm 15.5	14.09 \pm 8.0	0.211 \pm 0.03
	412 Lavera	September 2002	51.61 \pm 14.4	420.22 \pm 68.0	69.93 \pm 11.3	44.49 \pm 9.9	11.72 \pm 18.6	0.344 \pm 0.08
	512 Lavera	May 2003	14.31 \pm 2.0	463.63 \pm 91.1	256.28 \pm 47.8	119.43 \pm 23.2	7.88 \pm 6.1	1.300 \pm 0.50
	113 Fos harbour	May 2001	41.64 \pm 13.0	258.49 \pm 140.5	210.02 \pm 30.4	68.53 \pm 16.8	35.10 \pm 18.3	0.801 \pm 0.23
	213 Fos harbour	September 2001	41.86 \pm 5.3	406.73 \pm 51.4	113.25 \pm 26.6	54.35 \pm 21.9	30.47 \pm 14.9	0.557 \pm 0.30
	313 Fos harbour	May 2002	39.84 \pm 7.8	330.74 \pm 64.3	127.87 \pm 26.4	76.65 \pm 15.5	7.69 \pm 8.0	0.203 \pm 0.07
	413 Fos harbour	September 2002	57.71 \pm 14.4	455.77 \pm 68.0	69.26 \pm 11.3	51.99 \pm 9.9	35.50 \pm 18.6	0.275 \pm 0.12
	513 Fos harbour	May 2003	10.69 \pm 2.0	320.42 \pm 91.1	262.63 \pm 47.8	115.01 \pm 23.2	12.47 \pm 6.1	0.950 \pm 0.54
	114 Cortiou	May 2001	32.47 \pm 13.0	433.81 \pm 140.5	262.64 \pm 30.4	87.00 \pm 16.8	7.45 \pm 18.3	0.917 \pm 0.28
	214 Cortiou	September 2001	30.27 \pm 5.3	361.83 \pm 51.4	173.60 \pm 26.6	140.62 \pm 21.9	63.26 \pm 14.9	0.495 \pm 0.15
	314 Cortiou	May 2002	42.54 \pm 7.8	397.91 \pm 64.3	165.07 \pm 26.4	100.86 \pm 15.5	15.14 \pm 8.0	0.156 \pm 0.04
	414 Cortiou	September 2002	22.94 \pm 14.4	645.59 \pm 68.0	107.39 \pm 11.3	70.20 \pm 9.9	11.31 \pm 18.6	0.284 \pm 0.13
	514 Cortiou	May 2003	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Italy								
	121 Porto Fino	May 2001	58.87 \pm 13.0	733.02 \pm 140.5	194.74 \pm 30.4	75.30 \pm 16.8	65.94 \pm 18.3	0.946 \pm 0.28
	221 Porto Fino	September 2001	33.61 \pm 5.3	260.22 \pm 51.4	132.64 \pm 26.6	97.13 \pm 21.9	15.38 \pm 14.9	0.764 \pm 0.36
	321 Porto Fino	May 2002	45.18 \pm 7.8	634.09 \pm 64.3	162.62 \pm 26.4	75.16 \pm 15.5	15.60 \pm 8.0	0.192 \pm 0.09
	421 Porto Fino	September 2002	57.38 \pm 14.4	531.98 \pm 68.0	92.06 \pm 11.3	75.38 \pm 9.9	27.31 \pm 18.6	0.390 \pm 0.19
	521 Porto Fino	May 2003	20.73 \pm 2.0	805.11 \pm 91.1	319.27 \pm 47.8	119.38 \pm 23.2	16.35 \pm 6.1	0.715 \pm 0.24

Table IV (Continued)

Site	Station	Campaign	AChE activity in g (nmol/mn/mg protein) (mean \pm MCI)	GST activity in g (nmol/mn/mg protein) (mean \pm MCI)	GST activity in dg (nmol/mn/mg protein) (mean \pm MCI)	CAT activity in dg (μ mol/mn/mg protein) (mean \pm MCI)	BPH activity in dg (pmol/mn/mg protein) (mean \pm MCI)	MDA level in dg (nmol/mg protein) (mean \pm SE)
	122 Voltri	May 2001	52.08 \pm 13.0	584.81 \pm 140.5	192.77 \pm 30.4	80.35 \pm 16.8	68.51 \pm 18.3	1.057 \pm 0.25
	222 Vollri	September 2001	28.50 \pm 5.3	211.047 \pm 51.4	95.07 \pm 26.6	59.90 \pm 21.9	13.83 \pm 14.9	0.630 \pm 0.30
	322 Voltri	May 2002	46.73 \pm 7.8	372.42 \pm 64.3	122.96 \pm 26.4	64.48 \pm 15.5	12.03 \pm 8.0	0.218 \pm 0.11
	422 Votri	September 2002	47.40 \pm 14.4	452.30 \pm 68.0	64.10 \pm 11.3	46.33 \pm 9.9	32.47 \pm 18.6	0.287 \pm 0.09
	522 Voltri	May 2003	19.68 \pm 2.0	751.66 \pm 91.1	369.11 \pm 47.8	142.71 \pm 23.2	34.96 \pm 6.1	0.415 \pm 0.22
	123 Genoa in	May 2001	45.71 \pm 13.0	472.94 \pm 140.5	181.74 \pm 30.4	74.58 \pm 16.8	28.46 \pm 18.3	1.016 \pm 0.47
	223 Genoa in	September 2001	24.68 \pm 5.3	300.72 \pm 51.4	125.93 \pm 26.6	42.04 \pm 21.9	26.83 \pm 14.9	0.248 \pm 0.09
	323 Genoa in	May 2002	33.79 \pm 7.8	515.83 \pm 64.3	170.63 \pm 26.4	66.13 \pm 15.5	25.27 \pm 8.0	0.405 \pm 0.06
	423 Genoa in	September 2002	40.68 \pm 14.4	415.52 \pm 68.0	58.69 \pm 11.3	32.94 \pm 9.9	25.87 \pm 18.6	0.252 \pm 0.07
	523 Genoa in	May 2003	15.46 \pm 2.0	408.97 \pm 91.1	227.26 \pm 47.8	135.77 \pm 23.2	34.96 \pm 6.1	0.256 \pm 0.10
	124 Genoa out	May 2001	57.50 \pm 13.0	648.75 \pm 140.5	188.45 \pm 30.4	72.21 \pm 16.8	44.74 \pm 18.3	1.029 \pm 0.29
	224 Genoa out	September 2001	30.44 \pm 5.3	237.15 \pm 51.4	91.93 \pm 26.6	58.00 \pm 21.9	88.83 \pm 14.9	0.582 \pm 0.22
	324 Genoa out	May 2002	45.91 \pm 7.8	426.07 \pm 64.3	157.80 \pm 26.4	68.68 \pm 15.5	17.06 \pm 8.0	0.279 \pm 0.11
	424 Genoa out	September 2002	43.85 \pm 14.4	399.81 \pm 68.0	51.61 \pm 11.3	33.47 \pm 9.9	75.45 \pm 18.6	0.329 \pm 0.14
	524 Genoa out	May 2003	11.72 \pm 2.0	424.53 \pm 91.1	271.59 \pm 47.8	129.97 \pm 23.2	14.01 \pm 6.1	0.543 \pm 0.22
Spain								
	131 Cala Monjoy	May 2001	47.83 \pm 13.0	589.60 \pm 140.5	229.54 \pm 30.4	85.77 \pm 16.8	52.24 \pm 18.3	0.679 \pm 0.13
	231 Cala Monjoy	September 2001	27.79 \pm 5.3	265.99 \pm 51.4	171.16 \pm 26.6	135.94 \pm 21.9	18.49 \pm 14.9	0.481 \pm 0.22
	331 Cala Monjoy	May 2002	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	431 Cala Monjoy	September 2002	60.80 \pm 14.4	466.38 \pm 68.0	87.25 \pm 11.3	84.95 \pm 9.9	28.68 \pm 18.6	0.271 \pm 0.03
	531 Cala Monjoy	May 2003	12.24 \pm 2.0	270.66 \pm 91.1	271.09 \pm 47.8	112.18 \pm 23.2	27.33 \pm 6.1	1.023 \pm 0.47
	132 Fangal	May 2001	55.62 \pm 13.0	382.51 \pm 140.5	167.31 \pm 30.4	44.53 \pm 16.8	46.08 \pm 18.3	0.677 \pm 0.06
	232 Fangal	September 2001	14.89 \pm 5.3	189.94 \pm 51.4	123.24 \pm 26.6	116.82 \pm 21.9	36.62 \pm 14.9	1.373 \pm 0.86
	332 Fangal	May 2002	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	432 Fangal	September 2002	42.65 \pm 14.4	241.55 \pm 68.0	62.04 \pm 11.3	28.63 \pm 9.9	34.52 \pm 18.6	0.242 \pm 0.08
	532 Fangal	May 2003	14.50 \pm 2.0	275.59 \pm 91.1	216.19 \pm 47.8	107.51 \pm 23.2	10.12 \pm 6.1	0.699 \pm 0.35
	133 Los Alfaques	May 2001	55.79 \pm 13.0	351.42 \pm 140.5	128.94 \pm 30.4	42.79 \pm 16.8	38.73 \pm 18.3	0.812 \pm 0.38
	233 Los Alfaques	September 2001	27.27 \pm 5.3	598.15 \pm 51.4	120.11 \pm 26.6	61.74 \pm 21.9	9.96 \pm 14.9	0.294 \pm 0.23
	333 Los Alfaques	May 2002	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Table IV (Continued)

Site	Station	Campaign	AChE activity in g (nmol/mn/mg protein) (mean \pm MCI)	GST activity in g (nmol/mn/mg protein) (mean \pm MCI)	GST activity in dg (nmol/mn/mg protein) (mean \pm MCI)	CAT activity in dg (μ mol/mn/mg protein) (mean \pm MCI)	BPH activity in dg (pmol/mn/mg protein) (mean \pm MCI)	MDA level in dg (nmol/mg protein) (mean \pm SE)
433	Los Alfaques	September 2002	25.31 \pm 14.4	360.81 \pm 68.0	70.14 \pm 11.3	34.189 \pm 9.9	13.85 \pm 18.6	0.123 \pm 0.05
533	Los Alfaques	May 2003	16.57 \pm 2.0	481.56 \pm 91.1	186.48 \pm 47.8	110.82 \pm 23.2	5.07 \pm 6.1	0.471 \pm 0.11
134	Barcelona	May 2001	43.90 \pm 13.0	1054.39 \pm 140.5	236.40 \pm 30.4	40.34 \pm 16.8	46.35 \pm 18.3	1.516 \pm 0.68
234	Barcelona	September 2001	8.15 \pm 5.3	466.66 \pm 51.4	119.36 \pm 26.6	38.03 \pm 21.9	18.48 \pm 14.9	0.278 \pm 0.08
334	Barcelona	May 2002	nd	nd	nd	nd	nd	nd
434	Barcelona	September 2002	30.45 \pm 14.4	458.27 \pm 68.0	77.11 \pm 11.3	31.32 \pm 9.9	17.78 \pm 18.6	0.266 \pm 0.08
534	Barcelona	May 2003	5.99 \pm 2.0	427.61 \pm 91.1	275.83 \pm 47.8	175.99 \pm 23.2	11.46 \pm 6.1	0.821 \pm 0.31

n.d., Not determined; g, gills; dg, digestive gland; MCI, mean confidence interval; SE, Standard error.

Table V. Discriminatory levels for biomarkers of response obtained for each BEEP cruise in the Mediterranean Sea between 2001 and 2003.

Cruise	Biomarkers	Response factor (RF)	Response range (RR)	Confidence interval (CI)	Discriminatory factor (DF)	Discriminatory levels (DL)
May 2001 BEEP1	AChE g	3.77	63.93	26.00	3.46	2
	GST g	8.01	1181.97	281.00	5.21	4
	GST dg	3.44	234.24	60.80	4.85	3
	CAT dg	5.26	111.11	33.60	4.31	3
	BPH dg	293.50	122.78	36.60	4.35	3
Sept. 2001 BEEP 2	AChE g	12.33	44.29	10.60	5.18	4
	GST g	4.47	570.74	102.80	6.55	4
	GST dg	17.85	189.39	53.20	4.56	3
	CAT dg	9.16	170.37	43.80	4.89	3
	BPH dg	50.60	135.90	29.80	5.56	4
May 2002 BEEP 3	AChE g	1.49	16.50	7.83	2.05	2
	GST g	2.87	413.00	64.31	4.21	4
	GST dg	1.63	65.79	26.43	2.24	2
	CAT dg	2.08	69.59	15.15	3.30	3
	BPH dg	3.29	17.58	7.97	2.10	2
Sept. 2002 BEEP 4	AChE g	3.86	65.59	14.45	3.27	3
	GST g	2.67	404.04	67.98	3.97	4
	GST dg	2.08	55.78	11.3	3.47	4
	CAT dg	2.97	56.32	9.91	3.84	4
	BPH dg	6.67	64.14	18.59	2.73	3
May 2003 BEEP 5	AChE g	3.46	14.74	1.98	4.72	4
	GST g	2.97	534.4	91.08	3.93	4
	GST dg	1.36	182.63	47.76	2.91	3
	CAT dg	1.64	68.48	23.25	2.47	2
	BPH dg	6.90	29.89	6.12	3.44	3

pollution by organic compounds in Aragon, pollution by PAHs in Fos (especially in May 2001) and mixed pollution (heavy metals and organic compounds) in Cortiou.

Italian sites (Figure 2B) may be ranged by using the MPI average from five cruises as follows: Porto Fino (31), Genoa in (30), Voltri (29) and Genoa out (28). However, wide seasonal variations were shown in Genoa harbour (from orange to green) and in Voltri (from orange to blue). This last site appeared to be strongly impacted in May 2003. Biomarker contribution profiles suggested PAHs and heavy metals pollution in Genoa harbour and Voltri, especially in May 2001 and 2003. Porto Fino appeared impacted by organic pollution.

Spanish sites (Figure 2C) ranged from higher to lower MPI averages from four cruises: Barcelona (34), Cala Monjoy (32), and Los Alfaques and Fangal (22). The main temporal trend was observed in Barcelona harbour (from green to orange). Biomarker contribution profiles suggest pollution by heavy metals and organic compounds in Barcelona harbour and mixed pollution in Cala Monjoy (perhaps agricultural waste collected by the Lobregat River).

Genoa and Barcelona harbours were suspected to be hot spots from biomarker data collected during previous BIOMAR programme. Temporal trends were very high in these sites, suggesting 'false-negative' results related to a decrease in enzyme activities due to the toxic effects in biota due to high pollution levels.

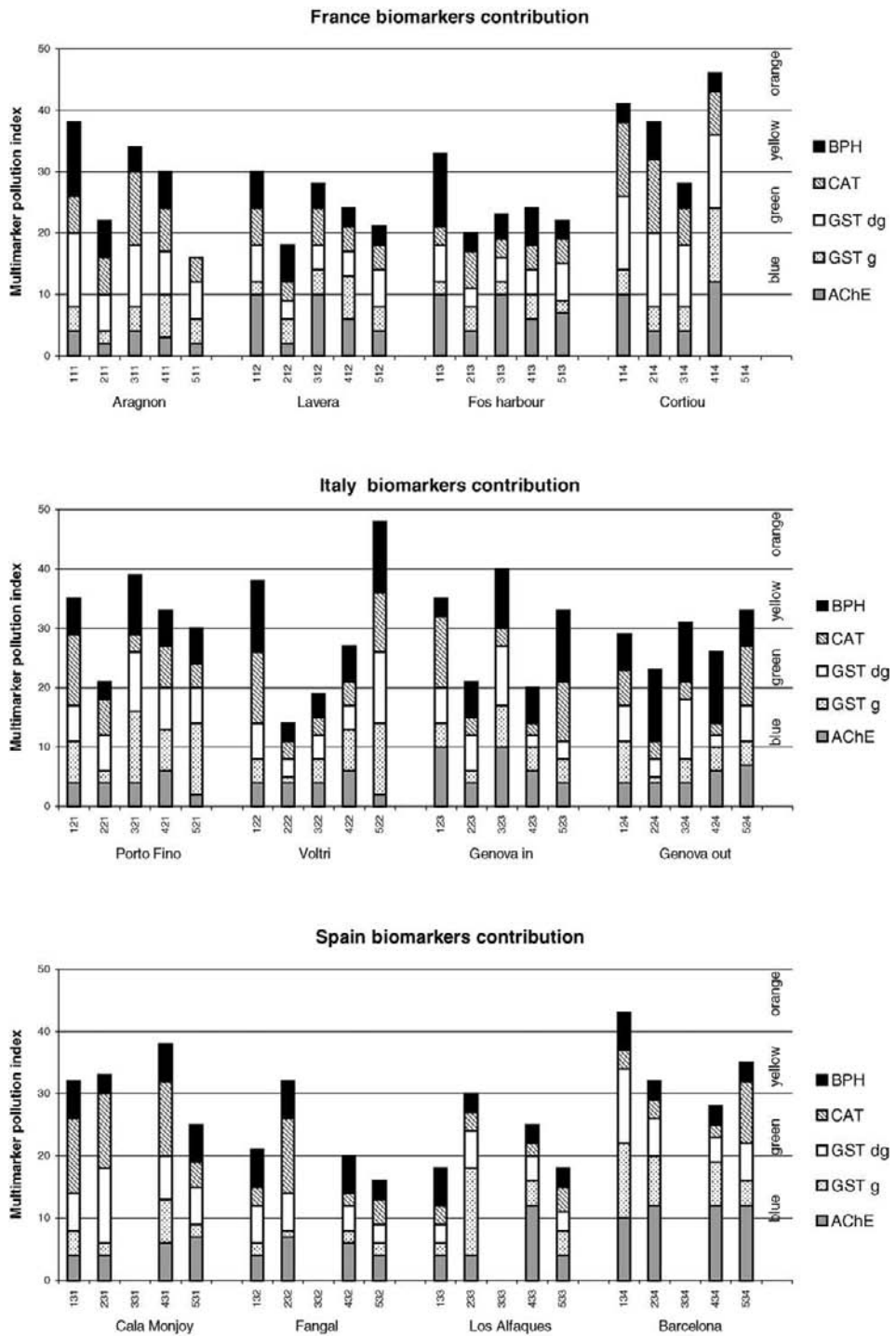


Figure 1. Contribution of each biomarker for each site studied during BEEP cruises 2001–03.

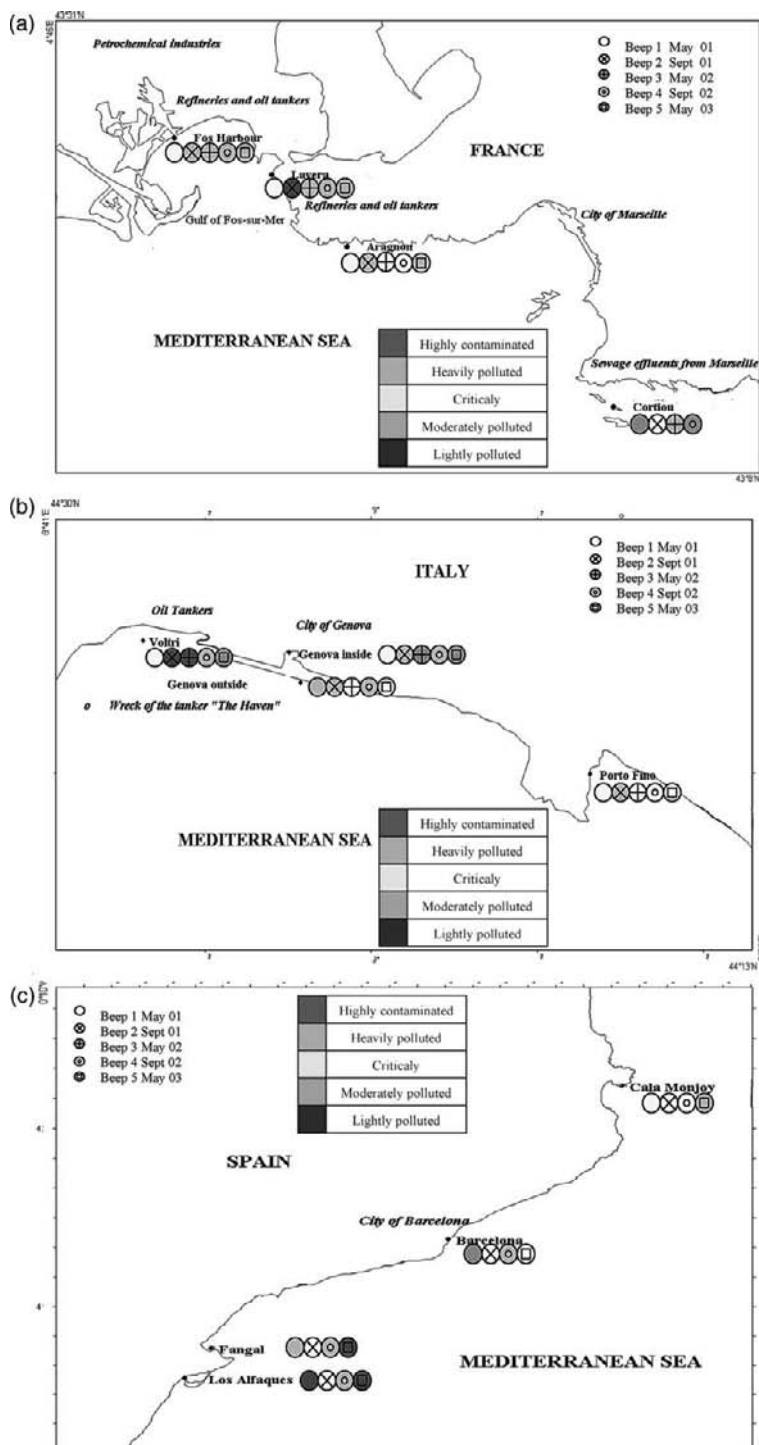


Figure 2. Temporal trends in multimarker pollution indexes (MPI) in working sites selected off France (A), Italy (B) and Spain (C) throughout the five BEEP cruises.

Discussion

Biomarkers are used increasingly in monitoring programmes for assessing environmental contamination. Many studies have, however, focused on single test organisms or limited arrays of biomarker responses to assess the health condition of complex ecosystems (Adams and Ryon 1994). These studies have demonstrated successful and cost-effective environmental assessments. Several biomarkers were also used in a pollution-monitoring programme for the Mediterranean Sea (Med Pol, UNEP 1997) with the aim of evaluating the toxic effects of pollutants on the marine organisms. The same test organisms were used across the study area and were chosen based on appropriate features and wide geographical distribution (the main selected organisms were mussels). Furthermore, a suite of relatively simple, sensitive and low-cost biomarkers (biomarkers of effect and exposure) was employed by the programme.

Lafontaine et al. (2000) measured five biomarkers (MT, EROD, DNA strand breaks, LPO, VG) in the soft tissues of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) in order to assess the spatial variation of exposure to contaminants along the St Lawrence River, Canada. The highest responses were measured in specimens from contaminated sites, indicating that the measurement of biomarker responses was feasible for monitoring programmes

Moore et al. (1999) reported on a large-scale biomarker-based biomonitoring programme for the Black Sea. The lysosomal integrity was strongly associated with suspended solid input and perceived pollution gradients. The study clearly demonstrated the biomarker's ability to pinpoint problem sites with complex contamination profiles allowing a more focused and effective use of the limited analytical resources.

A rapid assessment of the marine pollution (RAMP) programme developed by scientists from Plymouth University, UK (Wells et al. 2001), has been in operation in Brazil for 3–4 years. Local scientists received training in the easy-to-use, inexpensive and robust procedures.

Through programmes such as GIPME (Global Investigation of Pollution of the Marine Environment) funded by UNEP, techniques to assess the effects of contaminant on marine organisms using biomarkers have been developed. In addition, it is suggested that mussels are considered for use as test species.

With the use of more than one biomarker in monitoring, powerful multivariate statistics can be used to investigate the data and look for grouping or trends. Chevre et al. (2003), for example, evaluated effects at the cellular and molecular levels in the clam *Mya arenaria* with discrimination methods. Rough set analysis was used to classify sites and identify important biomarkers for defining the groups. The improvement of the methodology presented in this paper and carried out during the BEEP programme provides a procedure to select an appropriate biomarker of exposure able to discriminate hot spots and multi-exposure effects (discriminatory analysis).

Burgeot et al. (1996) used several biomarkers to assess biological and genotoxic effects of marine pollutants in the north-western Mediterranean Sea. A simple method summarizing biomarker responses was developed, thereby aiding interpretation. They used star plots to display results for a range of biomarkers and the integrated response was computed as the star plot area. The integrated response was then used to investigate spatial and temporal variation in contaminant exposure. The approach was applied to the Baltic Sea and English Channel sites during the BIOMAR programme,

and the integrated biomarker responses compared well with PAH and PCB levels measured in mussel and fish tissues (Beliaeff and Burgeot 2002).

In the same BIOMAR programme, the present authors have developed the MPI approach in order to give decision-makers enough information expressed in a simplified form (pollution scale; Narbonne et al. 1999). The pollution scale is now expressed as a coloured scale easily used for mapping pollution. This made it possible for 4000 km of the north coast of the Mediterranean coastline to be surveyed (BIOMAR and BEEP programmes). The MPI procedure has been used by other countries, especially from North Africa (Morocco and Tunisia).

However, it is generally reported that there is a difficulty in interpreting biomarker responses and the chemical analysis of main contaminants. The integrated suite of biomarkers of exposure, i.e. BPH, CAT and GST activities in digestive gland, AChE and GST in gills, expressed as an individual contribution to MPI, was used to identify the class of contaminant impacting on the aquatic environment.

It is very difficult to find any specific examples in the literature of failures of biomarker programmes. Undoubtedly failures have occurred, but these remain unreported. This is perhaps a reflection of the lack of general acceptance of biomarkers into routine monitoring programmes (Handy et al. 2003). Although the MPI procedure appeared well adapted to detect pollution gradients, trends measured in hot spots (Cortiou, Barcelona, Genoa), indicating a transitory decrease in the pollution index, suggest a false-negative response in highly polluted sites. In this case, low enzymatic activity was not related to a low pollution level but to acute toxicity inducing a decreased cellular metabolism. Selection of non-specific biomarkers indicating an acute toxic effect might be tested in order that is integrated into the MPI calculation.

Acknowledgements

The European Union (BEEP Project, Contract EVK3-CT2000-00025) is acknowledged for financial support, the IFREMER for shipping facilities, and G. Bocquéné and T. Burgeot for AChE and BPH biomarker measurements.

References

- Adams SM, Bevelhimer MS, Greeley MS, Levine DA, Teh SJ. 1999. Ecological risk assessment in a large river-reservoir: 6. bioindicators of fish population health. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18:628–640.
- Adams SM, Ryon MG. 1994. A comparison of health assessment approaches for evaluating the effects of contaminant-related stress on fish populations. *Journal of Aquatic Ecosystem Health* 3:15–25.
- Bayne BL, Clarke KR, Gray JS. 1988. Biological effects of pollutants: Results of a practical workshop. *Marine Ecology Progress Series*, 46, Oslo.
- Beliaeff B, Burgeot T. 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology Chemistry* 21:1316–1322.
- Boquene G, Galgani F, Truquet P. 1990. Characterisation and assay for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. *Marine Environmental Research* 30:75–89.
- Buege JA, Aust SD. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 50:302–310.
- Burgeot T, Bocquéné G, Porte C, Dimeet J, Santella RM, Garcia De La Parra LM, Pihol-Leszakowicz A, Raoux C, Galgani F. 1996. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series* 131:125–141.
- Chevre N, Gagne F, Gagnon P, Blaise C. 2003. Application of rough sets analysis to identify polluted aquatic sites based on a battery of biomarkers: a comparison with classical methods. *Chemosphere* 51:13–23.

- Clairborne A. 1985. Catalase activity. In: Greenwald RA, editor. Handbook of methods of oxygen radical research. Boca Raton, FL: CRC Press. p. 283–284.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Feartherstone RM. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7:88–95.
- Garrigues P, Raoux C, Lemaire P, Ribera D, Mathieu A, Narbonne JF, Lafaurie M. 1990. In situ correlations between polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and PAH metabolizing system activities in mussels and fish in the Mediterranean sea: preliminary results. *International Journal of Environmental Analytic Chemistry* 38:379–387.
- Goldberg ED, Bowen VT, Farrington JW, Harvey G, Martin J, Parker PL, Risebourg R, Robertson W. 1975. The mussel watch. *Marine Pollution Bulletin* 5:101–126.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249:7130–7139.
- Handy RD, Galloway TS, Depledge MH. 2003. A proposal for the use of biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology. *Biomarkers* 12:331–343.
- Huggett RJ, Kimberle RA, Mehrle PM Jr, Bergman HL. 1992. Biomarkers, biochemical, physiological and histological markers of antropogenic stress. Boca Raton, FL: Lewis.
- Labrot F, Ribera D, Saint Denis M, Narbonne JF. 1996. In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: Lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non mammalian species. *Biomarkers* 1:21–28.
- Lafontaine Y, Gagné F, Blaise C, Costan G, Gagnon P, Chan HM. 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic Toxicology* 50:51–71.
- Livingstone DR. 1991. Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. In: Gilles R, editor. *Advances in comparative and environmental physiology*. Berlin: Springer. vol. 7, p. 45–185.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AZL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193:265–275.
- McCarthy JF, Shugart LR. 1990. Biomarkers of environmental contamination. Boca Raton, FL: Lewis.
- Michel X, Salaun JP, Galgani F, Narbonne JF. 1994. Benzo(a)pyrene hydroxylase activity in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*: a potential marker of contamination by polycyclic aromatic hydrocarbon-type compounds. *Marine Environmental Research* 38:257–273.
- Moore MN, Wade T, Wedderburn RJ, Lowe DM, Balashov G, Buyukgun-Gor H, Daurova Y, Denga Y, Kostylev E, Mihnea PE, Moncheva S, Tabagari S, Ciocan C, Ozkoc H, Depledge MH. 1999. The UNESCO/IOC 'Black Sea Mussel Watch Pilot Study': Biological effects and contaminant residues. In: *Black Sea pollution assessment*. Black Sea Environmental Series Vol. 10. New York: United Nations Publ. p. 279–292.
- Najimi S, Bouhaimi A, Daubeze M, Zekhnini A, Pellerin J, Narbonne JF, Moukrim A. 1997. Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution in Agadir marine bay (South of Morocco). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 58:901–908.
- Narbonne JF, Daubeze M, Clerandau C, Garrigues P. 1999. Scale of classification based on biochemical markers in mussels: application to pollution monitoring in European coasts. *Biomarkers* 4:415–424.
- Narbonne JF, Garrigues P, Ribera D, Raoux C, Mathieu A, Lemaire P, Salaun JP, Lafaurie M. 1991. Mixed function oxygenase enzymes as tools for pollution monitoring: field studies on the French coast of the Mediterranean Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology* 100C:37–42.
- Pellerin-Massicotte J. 1994. Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine bivalves. *Journal of Aquatic Ecosystem Health* 3:101–111.
- Prahash NT, Rao KSJ. 1995. Modulations in antioxidant enzymes in different tissues of marine bivalve *Perna viridis* during heavy metal exposure. *Molecular and Cellular Biochemistry* 146:107–113.
- Regoli F, Principato G. 1995. Glutathione, glutathione-dependant and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metal under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquatic Toxicology* 31:143–164.
- Suteau P, Daubeze M, Migaud ML, Narbonne JF. 1988. PAH-metabolizing enzymes in whole mussels as biochemical test for pollution monitoring. *Marine Ecology Progress Series* 46:45–49.
- UNEP. 1997. Report of the meeting of experts to review the MED POL biomonitoring programme. UNEP-(OCA)/MED WG.132/7. Athens: UNEP.
- Wells PG, Depledge MH, Butler JN, Manock JJ, Knap AH. 2001. Rapid toxicity assessment and biomonitoring of marine contaminants. Exploiting the potential of rapid biomarker assays and microscale toxicity tests. *Marine Pollution Bulletin* 42:799–804.

Résumé : Ce travail s'insère dans un programme de validation des biomarqueurs chez l'espèce sentinelle *Corbicula fluminea* pour leur utilisation *in situ*.

L'objectif de cette étude prospective est la détermination de marqueurs biologiques susceptibles de venir des biomarqueurs d'effets chez *C. fluminea*. Ces marqueurs ont été choisis parmi les grandes fonctions, afin de refléter les diverses altérations pathologiques dues à l'exposition à un contaminant.

Des expérimentations en laboratoire nous ont permis de développer ces marqueurs (adaptation sur *C. fluminea* et sélection des marqueurs en fonction de leur réponse). L'application en mésocosme (conditions semi-contrôlées) des marqueurs sélectionnés (mesure des bases oxydées en génotoxicité, activité de la phagocytose en immunotoxicité et changements structuraux des lysosomes pour l'état général), nous a permis de les valider en tant que biomarqueurs d'effets chez *C. fluminea*.

Mots clés : biomarqueurs, bivalve, *Corbicula fluminea*, cadmium, eau douce, génotoxicité, 8-oxodG, immunotoxicité, phagocytoses, reprotoxicité, état général, lysosomes, méthacrylate de méthyle, mélanges, rivières artificielles.

Abstract: This work belongs to a programme of validation of biomarkers in the sentinel specie *Corbicula fluminea*, for their use in the field.

The aim of this prospective study is to determinate some biological markers that could became biomarkers of effects in *C. fluminea*. These markers were chosen among great physiological functions in order to reflect the several pathological alterations undergone during the exposure to a contaminant.

These markers were developed in several laboratory experiments as they were adapted to *C. fluminea* and selected depending of their responses. Markers (oxydated base in genotoxicity, phagocytosis activity in immunotoxicity and lysosomal structural changes for assessing the general state) were validated in mesocosms experiments as biomarkers of effects that can be applied to *C. fluminea*

Keywords: biomarkers, bivalve, *Corbicula fluminea*, cadmium, freshwater, genotoxicity, 8-oxodG immunotoxicity, phagocytosis, reprotoxicity, general state, lysosomes, methyl methacrylate, mixtures, artificial streams.

Laboratoire de Physico-Toxico-Chimie des systèmes naturels (LPTC), UMR CNRS 5472, Groupe de Toxicologie Biochimique, Université Bordeaux 1, avenue de Facultés, 33405 Talence, France.