

N° d'ordre : 2818

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE BORDEAUX 1

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

Par **Nadia AARAB**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPECIALITE : ECOTOXICOLOGIE DES MILIEUX AQUATIQUES

**LES BIOMARQUEURS CHEZ LES POISSONS ET LES BIVALVES :
DE L'EXPOSITION A L'EFFET ET DU LABORATOIRE AU TERRAIN**

Soutenue le 19 mai 2004

Après avis de :

M Peter-Diedrich Hansen	Professeur Université de Berlin	Rapporteur
M François Leboulenger	Professeur Université Le Havre	Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

M Peter-Diedrich Hansen	Professeur Université de Berlin	Rapporteur
M François Leboulenger	Professeur Université Le Havre	Rapporteur
M Jean-François Narbonne	Professeur Université Bordeaux1	Examineur
M Abdelatif Moukrim	Professeur Université Ibnou-Zohr	Examineur
M Thierry Burgeot	Chercheur, IFREMER Nantes	Examineur
M Christophe Minier	Maître de Conférences Le Havre	Invité
M Philippe Garrigues	Directeur de Recherche CNRS	Président du jury Rap. de soutenance

A mon père, à ma mère,

à mon frère Abdelilah,

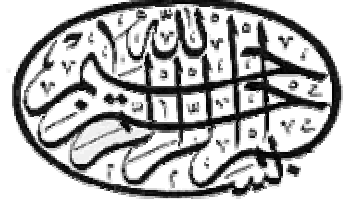
à mes sœurs :

Loubna,

Najoua

Sanae,

à tous ceux qui me sont chers.



وَ هُوَ الَّذِي سَخَّرَ الْبَحْرَ لِتَأْكُلُوا مِنْهُ لَحْمًا طَرِيًّا وَ تَسْتَخْرِجُوا مِنْهُ
حَلِيَّةً تَلْبَسُونَهَا وَ تَرَى الْفُلْكَ مَوَآخِرَ فِيهِ وَ لَتَبْتَغُوا مِنْ فَضْلِهِ وَ
لَعَلَّكُمْ تَشْكُرُونَ (14) مِنْ سُورَةِ النَّحْلِ.

Remerciements

Les recherches qui ont fait l'objet de cette thèse ont été réalisées dans le Laboratoire de Physico-Toxico-Chimies des Systèmes Naturels (LPTC) de l'Université Bordeaux1 et en collaborations avec des laboratoires nationaux et internationaux.

Le sujet de cette thèse s'inscrit dans le cadre du programme Européen BEEP (Biological Effects of Environmental Pollution) et dans le cadre aussi du programme FISHBIO.

Les encouragements à entreprendre de terminer ce travail ont été trop nombreux pour que je puisse remercier ici tous ceux qui m'ont aidé et je vais certainement commettre de nombreuses injustices et de nombreux oublis dans la liste suivante qu'il me soit pardonné.

J'exprime toute ma gratitude aux membres de jury qui ont accepté la lourde tâche de juger ce travail.

Je suis très honorée de la présence du Pr **François Leboulenger**, Directeur du Laboratoire d'Ecotoxicologie des Milieux Aquatiques à l'Université du Havre (LEMA). Vous m'avez apporté une aide inestimable en m'accordant largement votre attention et en me prodiguant vos conseils. Je n'oublierai pas votre accueil chaleureux au sein de votre équipe au Havre et je suis très reconnaissante de l'intérêt que vous m'avez porté en toutes circonstances.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Pr **Peter-Diedrich Hansen**, Directeur du Laboratoire d'Ecotoxicologie à l'Université Technique de Berlin. Je vous remercie d'avoir parcouru tout ce chemin pour participer à ce jury. Merci pour votre accueil chaleureux et tonique au sein de votre laboratoire, votre confiance, votre enthousiasme, vos conseils et vos encouragements ont été un soutien efficace.

Je remercie le Dr **Thierry Burgeot**, chercheur à l'Institut Français de Recherche et d'Exploitation de la Mer (IFREMER) pour avoir bien voulu participer au jury de ce travail. Ses travaux de recherches et son expérience dans le domaine des biomarqueurs, m'ont fait souhaiter sa présence dans ce jury.

Pr **Abdellatif Moukrim**, Directeur du Laboratoire Eaux et Environnement (LEE) de la Faculté des Sciences d'Agadir, Université Ibnou Zohr. Cela fait presque 9 ans que nous nous connaissons depuis ma première année de faculté. En licence, j'ai eu plus de contacts avec vous. Vous m'avez permis de suivre des études océanographiques, vous m'avez suivi durant tous mes stages au Maroc malgré vos multiples occupations. Et encore maintenant votre soutien continue. Vos conseils m'ont aidé tout au long de mon cursus universitaire. L'aboutissement de cette thèse serait, pour nous tous, l'expression de ma profonde reconnaissance, mes sincères remerciements.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude à mon Directeur de Thèse, Pr **Jean-François Narbonne**, Responsable du groupe de Toxicologie Biochimique (LPTC), et au Dr **Philippe Garrigues**, Directeur de Recherche au CNRS et Directeur du LPTC. Je tiens également à vous remercier pour la confiance et pour la grande liberté que vous m'avez accordée dans mes recherches, et qui m'a permis d'acquérir l'autonomie nécessaire pour arriver à ce stade ainsi que dans mes collaborations avec les autres laboratoires. Vous m'avez permis d'aller chercher des techniques dans d'autres laboratoires (Norvège, Allemagne, Havre), en congrès (Grèce, Floride, Espagne, Paris, Rochelle,...) merci encore pour cette confiance.

J'ai eu la grande chance de travailler sur le projet européen BEEP et de collaborer au cours de ma thèse, avec des personnalités formidables, tant du point de vue de leur rigueur scientifique que de leurs qualités humaines :

Je remercie tout particulièrement le Dr **Christophe Minier**, Maître de conférences à l'Université du Havre, pour sa précieuse collaboration dans ce travail. Il a su me faire partager, ses nombreuses connaissances et expériences scientifiques dans le domaine des perturbateurs endocriniens. Il a été un des rares à m'apporter « un réel soutien » dans ce domaine. Son esprit, sa rigueur extrême et ses qualités humaines m'ont été très précieux. Je renouvelle ici ma sincère amitié.

Je remercie sincèrement le Pr **Catherine Bennetau-Pelissero**, de l'Ecole Nationale d'Ingénieur des Travaux Agricoles de Bordeaux, pour son accueil dans son équipe et qui m'a souvent accordé des séances de discussion sur les cultures d'hépatocytes. Je tiens aussi à remercier Valérie, Karine pour leurs conseils et leur patience ainsi que leur gentillesse durant mon initiation à la culture primaire d'hépatocytes.

Je souhaite également faire part de toute ma reconnaissance au Dr **Eckehardt Unruh** du Laboratoire d'écotoxicologie de l'université de Berlin pour son aide et mon initiation aux dosages de la VTG-Like chez les bivalves. Merci aussi pour ton soutien amical durant tout mon séjour en Allemagne.

Sans l'aide du Dr **Blandine Davail-Cuisset**, maître de conférence à Bordeaux 1, pour les dosages des stéroïdes, ce travail aurait souffert d'un manque de rigueur scientifique. Je n'oublierais jamais son aide depuis notre première rencontre jusqu'à la fin de ce travail. Merci encore pour sa disponibilité, sa rigueur et ses encouragements.

La partie *in vivo* de mon travail a été effectuée en Norvège à Akvamiljø Rogaland Research (Stavanger). Il m'a été particulièrement agréable et enrichissant d'y travailler avec l'équipe. Je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance aux Mr Dr **Odd Ketil Andersen**, Dr **Bodil Larsen**, Dr **Anne Bjørnstad**, Dr **Andre Aas**, Dr **Lionel Camus**. Leur aide, leur sympathie, leur soutien, et leur générosité m'ont permis de travailler dans un environnement agréable et d'être plus efficace dans les dissections. Merci encore pour votre accueil et surtout de votre sincère amitié.

Je remercie Pr **Jan Adrianus Veenstra** du laboratoire de neurosciences bordeaux1 de m'avoir permis d'utiliser son matériel à maintes reprises.

J'ai une pensée amicale également à l'ensemble des participants scientifiques et équipages des campagnes océanographiques sur « l'EUROPE ». J'ai passé des moments inoubliables autant dans l'eau (Christophe, Nedjad, Jennifer,...) que sur le bateau, sans oublier la sympathie de notre chef de mission le Dr **Gilles Bocquené**.

Merci au capitaine **Albert** de son soutien moral pendant les tempêtes en Méditerranée (les missions parfois agitées). Je regretterai sans doute les longues discussions dans le carré et les fous rires partagés.

Un grand merci aussi aux pêcheurs et à l'ensemble du personnel du CSP (Conseil Supérieur du Pêche) qui s'occupe du Bassin Sud Ouest de France, qui ont mis à ma disposition leurs moyens et leurs temps pour les prélèvements et aussi au vétérinaire Monsieur **Patrick Girard** pour son aide précieuse en parasitologie du poisson.

Trois ans et demi passées avec vous au labo, une période qui compte dans ma vie. J'ai appris pas mal de choses, j'ai appris à être autonome, chercher des collaborations, savourer le bonheur et le malheur de la recherche.

Je vous adresse mes sincères remerciements et ma sympathie à tous les membres du LPTC qui d'une manière ou d'une autre, ont apporté leur pierre à ce travail

Michelle Daubèze, pour son aide généreuse et ces conseils techniques,...

Christelle Clerandeu, pour son aide morale, son amitié et ces critiques constructives,...

Dr **Pascal Mora**, qui m'a initiée à l'HPLC au début de ma thèse, sa présence et ces conseils judicieux, toujours présent pour me donner des conseils.

Dr **Sylviane Lemaire**, maître de conférence à Bordeaux 1, je n'ai pas eu l'occasion de travailler avec toi dès ma première année thèse, mais on s'est rattrapé. Merci pour tes aides en histologie, ta correction du manuscrit et tes conseils constructifs.

Dr **Michel Cornet**, chercheur au Centre d'océanologie à Bordeaux1, merci pour ta gentillesse, tes encouragements et les séances de discussions ont été un enrichissement pour moi, je salue en toi aussi ta curiosité scientifique.

Dr **Daniel Ribera**, directeur de BIOTOX j'ai bien aimé tes discussions et tes critiques soit sur le plan scientifiques ainsi que sur le plan de la vie quotidienne, mais tu sais Daniel je resterai toujours la petite marocaine curieuse et battante mais je n'oublie pas ta phrase «*c'est un bonheur d'avoir une étudiante marocaine au labo*».

Pr **Ijsbrand Kramer**, merci pour ton aide, ta sympathie et tes critiques constructives

Merci à **Olivier** et à toute l'aide que tu as pu m'apporter durant tout mon travail. Je te passe le relais et c'est à toi de continuer,...Bon courage pour la rédaction.

Mes plus vifs remerciements vont à :

Daniela, Anne, Lionel, Filippo, Vanessa, Marine, Philippe, Hannane, Mokhtar, Tarik, Bouchra, Youssef et Khalid pour vos discussions animées, les bons moments de notre amitié.

Aucun mot ne sera capable de transmettre tout ce que je vous dois. Que ce travail soit une expression de ma plus grande affection envers vous.

Enfin, une pensée plus particulière et très chaleureuse pour **mes parents** qui m'ont toujours soutenus tout au long de mon parcours. Sans leur soutien permanent cette thèse n'aurait pas pu voir le jour. Malgré la distance qui nous sépare, je pense toujours à vous chaque jour. Ce sont votre amour et votre sacrifice qui m'ont poussées d'aller à réaliser un de mes rêves qui fut l'un des vôtres. Avec toute mon estime et tout mon amour, je vous dédie ce mémoire, il est le fruit de vos encouragements.

Abdelilah, mon cher frère, tu t'es maintes fois amusé de mes compétences ! Mais si j'ai une chose à te présenter aujourd'hui ; c'est un bout de mon rêve de 240 pages !

A ma sœur bien aimée **Loubna**, merci pour ton aide morale et pratique. Tu as préféré sacrifier tes vacances d'été pour me donner un coup de main pendant notre déplacement au Havre merci encore une fois.

Enfin un clin d'œil à mes sœurs, **Najoua et Sanae**, avec qui j'ai partagé tous les moments de bonheur et de malheur de cette thèse. Elles étaient là pour me supporter et pour maintenir mon moral au beau fixe, même si parfois soumis à rudes épreuves. Je garderai de bons souvenirs de tous nos moments passés ensemble. Vivre loin de nos parents, ce n'était pas toujours chose facile mais nos motivations ont été les plus fortes. Malgré les petites engueulades pour faire la cuisine et les tâches ménagères. Merci encore.

sommaire

SOMMAIRE

ABBREVIATION	8
INTRODUCTION GENERALE	10

PARTIE I : LES BIOMARQUEURS D'EXPOSITION : APPLICATION A LA SURVEILLANCE BIOLOGIQUE DES MILIEUX AQUATIQUES

Chapitre I : Généralités

I - Les polluants environnementaux	19
1 - Les polychlorobiphényles : (PCB)	20
2 - Les hydrocarbures aromatiques polycycliques : (HAP)	22
3 - Les métaux	25
4 - Les pesticides	26
II - Les réactions de biotransformation	27
III - Les biomarqueurs utilisés	31
1 - Acétylcholinestérase (AChE)	31
2 - Ethoxyrésorufine O-dééthylase (EROD)	32
3 - Activité Benzo(a)pyrène Hydroxylase chez la moule	36
4 - Glutathion-S-transférase (GST)	37
5 - Catalase (CAT)	38
6 - Malonedialdéhyde (MDA)	39
7 - Détection de métabolites d'HAP dans la bile	40

Chapitre II : Application au milieu marin

I Matériels et méthodes	43
1- Les sites d'études	44
a)- Site 1 : Golfe de Fos sur Mer-Marseille (France)	44
b)- Site 2 : Côte Occidentale de Ligurie (Italie)	45
c)- Site 3 : Côte du delta de l'Ebre (Espagne)	45
2- Choix de l'espèce sentinelle : la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i>	46
a)- Généralités	46
b)- Intérêt de la moule comme espèce sentinelle	47
3- Echantillonnage	48

4-Dosage biochimiques	50
II Résultats	51

ARTICLE 1:

Scale of classification based on biochemical markers in mussel: application to pollution monitoring in Mediterranean coasts and temporal trends. Narbonne J.F., Aarab N., Clérandeau C., Daubèze M., Narbonne J., Champeau O. and Garrigues P. Soumise à *Biomarkers*

Chapitre III : Application au milieu dulçaquicole

I Matériels et méthodes	72
1- Démarche expérimentale	72
2- Les espèces étudiées	73
a)- Le chevaine	73
b)- Le barbeau	74
c)- La truite arc-en-ciel	74
3- Localisation des sites étudiés	76
4- Prélèvement et préparations des échantillons sur le terrain	77
5- Analyse chimique	
6- Dosage des marqueurs biochimiques	83
7- Traitement statistiques des données	84
II Résultats	86
1- Mesure des marqueurs biochimiques	86
2- Dosage chimiques.	86
a)- Au niveau du sédiment	86
b)- Au niveau du poisson	88
b)- Au niveau de l'eau	91

ARTICLE 2:

Scoring approach based on fish biomarkers applied to French river monitoring.

Nadia AARAB, Pascal MORA, Olivier CHAMPEAU, Michel DAUBEZE, Philippe

GARRIGUES and Jean François NARBONNE§. Acceptée après révision à la revue "

Biomarkers"

PARTIE II : LES BIOMARQUEURS D'EFFETS : LES PERTURBATIONS ENDOCRINIENES *IN VIVO* ET *IN VITRO*

INTRODUCTION GENERALE

1- Introduction	112
2- Le système endocrinien	113
3- Les substances susceptibles de perturber le système endocrinien	114
4- Modes d'action des perturbateurs endocriniens	118
5- Quelques effets sur les vertébrés et les invertébrés.	119
6- Le système endocrinien chez les poissons	122
7- Méthodes d'évaluation	124

Chapitre I : ETUDE *IN VITRO* : Synthèse de la vitellogénine par des cultures d'hépatocytes de truite arc-en-ciel *in vitro*

1-Cultures d' hépatocytes	127
2-Substances testées :	128
3-Méthode (Voir Figure 2)	131
a)-Préparation du foie	130
b)-Préparation des hépatocytes	130
c)-Induction des hépatocytes	131
4-Dosage de la VTG dans le milieu de culture	132
a)- Principe	132
b)- Dosage (Tableau 2)	132
5-Résultats	133

Chapitre II : ETUDE *IN VIVO*

I Les produits testés	135
1-Le pétrole : les hydrocarbures	135
a) Généralités	136
b) Effets sur la reproduction	136
2- Alkylphénols éthoxylates :	137
a) Structure et caractéristiques chimiques	137
b) Domaine d'utilisation des nonylphénols:	137
c) Le devenir des alkylphénols dans l'environnement	138
d) Effets sur la reproduction	139
II Démarche expérimentale	140
A- Modèles animaux	140
1- Modèle Vertébré : Le turbot <i>Scophthalmus maximus</i>	141

a)- Présentation du modèle	141
b)- Protocole d'exposition	142
2- Modèle Invertébré : La moule <i>Mytilus edulis</i>	142
a)- Présentation du modèle (voir 1er chapitre)	142
b)- Rappel sur l'organisation de l'appareil génital	144
c)- Protocole d'exposition	144
B- Les hormones	144
1- Extraction des hormones	144
2- Principe du test ELISA	144
3- Dosage de la 11-cétotestosterone (11-KT)	145
4- Dosage du 17 β -oestradiol (17 β -E2)	146
5- Dosage de la testostérone (T)	146
C- La vitellogénine (VTG)	146
D- Histologie	147
III Résultats et discussion	147
A- Le Turbot	147
1- Indice gonado-somatique	147
2- Paramètres plasmatiques	148
a) 17 β Oestradiol	148
b) La Vitellogénine	148
c) Testostérone (T)	148
d) 11 Céto-testostérone (11-KT)	150
e) Discussion des dosages des paramètres plasmatiques	150
3- Histologie	152
a)- Foie	152
b)- Intestin	153
c)-Gonades	153
CONCLUSION	154
B- La moule	159

ARTICLE 3: Biochemical and histological responses in mussel (*Mytilus edulis*) exposed to North Sea oil and to a mixture of North Sea oil and alkylphenols

N. Aarab^{1*}, C. Minier², S. Lemaire¹, E. Unruh³, P.-D. Hansen³, B.K. Larsen⁴, O.-K. Andersen⁴, J.-F. Narbonne¹. *Sous presse Marine Environmental Research*

ARTICLE 4: Biochemical and histological responses in mussel (*Mytilus edulis*) exposed to Bisphenol A, Diallylphthalate and Tetrabromodiphenyl ether

N. Aarab, S. Lemaire-Gony, E. Unruh, P.D. Hansen, B.K. Larsen, O.K. Andersen, J.F. Narbonne. *Soumise Marine Environmental Research*

Chapitre III : ETUDE *IN VITRO* DES METABOLITES DE LA TESTOSTERONE

** *****

1- Métabolisme endogène catalysé par les cytochromes P450	175
a)- Exemple des stéroïdes	175
b)- Les stéroïdes et la testostérone	175
2- La testostérone : substrat modèle des cytochromes P-450	177
3- Matériels et méthodes	180
a)- Les animaux	180
b)- Méthode	181

Article 5: *IN VITRO* METABOLISM OF TESTOSTERONE IN AQUATIC ORGANISMS : IMPROVEMENT OF METABOLITES DETECTION IN FISH AND MOLLUSCS. Nadia Aarab, Pascal Mora & Jean François Narbonne.

Soumise à Analytical and Bioanalytical Chemistry

CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES	197
REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUES	201
ANNEXES	216

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Introduction

- Figure 1 :** Représentation schématique des différents types de paramètres biomoléculaires, biochimiques ou physiologiques mesurables à différents niveaux d'organisation de l'individu, la communauté pour évaluation de l'état de l'environnement (d'après Adams, 2000)
- Figure 2 :** Représentation des méthodologies permettant d'évaluer les risques écotoxicologiques (Lagadic *et al.*, 1997)
- Figure 3 :** Relations entre les principaux contaminants et les marqueurs biologiques (d'après Narbonne & Michelle 1993).

1^{ère} PARTIE : LES BIOMARQUEURS D' EXPOSITION : APPLICATION A LA SURVEILLANCE DES MILIEUX AQUATIQUES

Chapitre 1 : Généralités

☞ *Figures*

- Figure 1 :** Sources des polluants dans l'environnements.
- Figure 2 :** Structure générale des PCB.
- Figure 3 :** Toxicité de certains congénères des PCB.
- Figure 4 :** Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).
- Figure 5 :** Cycle catalytique du cytochrome P450 (d'après Halkier, 1996).
- Figure 6 :** Fluctuations naturelles d'un écosystème.
- Figure 7 :** Rôle de cytochrome B5 et du complexe CBR (cytochrome P450 réductase) dans le fonctionnement des CYP450.

☞ *Tableaux*

- Tableau 1 :** Les principales enzymes et réactions de la phase I et II (d'après Livingstone, 1991)
- Tableau 2 :** Principales réactions de phase II. (d'après Livingstone. ; 1991).
- Tableau 3 :** Induction de l'activité EROD mesurés sur quelques espèces de poisson d'eau douce exposées à des contaminations chimiques *in situ*.
- Tableau 4 :** Relation concentrations-réponse observées in situ chez les différents poissons d'eau douce.

Chapitre 2 : Milieu Marin

☞ *Figures*

- Figure 8 :** Schéma des voies génitales a) femelles avant la ponte, vue latérale. b) le processus génital vue ventral.
- Figure 9 :** localisation des sites d'échantillonnage.

Figure 10: Utilisation des tissus de moule (*Mytilus edilus*) pour les mesures des marqueurs biochimiques.

Chapitre 3 : Milieu Dulçaquicole

☞ Figures

Figure 1 : Pêche électrique pendant les campagnes de prélèvement FISHBIO

Figure 2 : Les espèces de poisson étudiés

Figure 3 : Carte des sites de prélèvement dans le Bassin de Sud Ouest

Figure 4 : Utilisation des tissus de poisson, des sédiments et de l'eau prélevés sur les sites pour les différents dosages biochimiques et chimiques

Figure 5 : Protocole d'analyse des HAP et des PCB

Figure 6 : Principe du dosage de l'EROD

Figure 7 : Les différentes PCB mesurés dans les muscles de poissons récoltés sur les différents sites de prélèvement.

Figure 8 : Les différentes PCB mesurés dans les foies de poissons récoltés sur les différents sites de prélèvement.

Figure 9 : Taux des pesticides mesurés dans l'eau des sites de prélèvements

☞ Tableaux

Tableau 1 : les sites de prélèvement sur les cinq rivières

Tableau 2 : Abréviations utilisées pour les HAP dosés.

Tableau 3 : Concentrations en HAP, PCB et métaux dans les sédiments récoltés sur les différents sites de prélèvement pour les trois espèces de poissons.

Tableau 4 : Concentrations en HAP PCB et métaux dans les muscles de poissons récoltés sur les différents sites de prélèvement.

Tableau 5 : Les différentes PCB mesurés dans les foies de poissons récoltés sur les différents sites de prélèvement.

2^{ème} PARTIE : BIOMARQUEURS D'EFFET : PERUTRIBUTEUR ENDOCRINIENS

Introduction

☞ Figures

Figure 1 : Structure chimique de quelques substances à effets oestrogénique

Figure 2 : Action des contaminants sur les récepteurs oestrogéniques.

Figure 3 : Principaux sites d'action des contaminants sur le système endocrinien des poissons .

Figure 4 : Schéma de synthèse des hormones stéroïdiennes à partir du cholestérol.

☞ Tableaux

Tableau 1 : Classification chimique des hormones et mode de transport.

Tableau 2 : Concentration en composés oestrogéniques dans les aliments.

Chapitre 1 : Etude *in vitro*

Figure 3: Les différentes étapes de culture d'hépatocytes de truite -arc-en ciel.

Figure 4: Pouvoir oestrogénique des contaminants testés.

☞ Tableaux

Tableau 1 : Différentes étapes de l'ELISA de VTG de truite -arc-en ciel.

Chapitre 2 : Etude *in vivo*

☞ Figures

Figure 1 : Exposition de turbot à 0,5ppm de pétrole de la Mer du Nord (NSO), 0,1ppm nonylphénol et à 0,5ppm NSO+0,1ppm alkylphénols pour une durée de trois semaines.

Figure 2 : Exposition des moules au pétrole de la Mer du Nord 0,5ppm (NSO), au mélange NSO (0,5ppm) + alkylphénols (0,1ppm) nonylphénol (trois semaines).

Figure 3 : Taux de 17- β oestradiol mesurés dans le plasma des turbots mâles et femelles exposés aux différents contaminants.

Figure 4 : Taux du vitellogénine mesurés dans le plasma des turbots mâles et femelles exposés aux différents contaminants.

Figure 5 : Taux de testostérone mesurés dans le plasma des turbots mâles et femelles exposés aux différents contaminants.

Figure 6 : Taux du 11 cétestostérone mesurés dans le plasma des turbots mâles et femelles exposés aux différents contaminants.

Figure 7 : Coupe histologique de foie de turbots témoins.

Figure 8 : Coupe histologique de foie de turbots exposés au pétrole du Mer du Nord.

Figure 9 : Coupe histologique de foie de turbots exposés au nonylphénol.

Figure 10 : Coupe histologique de foie de turbots exposés au mélange.

Figure 11 : Coupe histologiques de l'intestin de turbots exposés aux différents contaminants.

Figure 12 : Coupe histologiques de gonades de turbots femelles exposés aux différents contaminants.

Figure 13: Coupe histologiques d'ovaires de turbot : détail des ovocytes exposés aux différents contaminants.

Figure 14: Coupe de testicules de turbot.

☞ Tableaux

Tableau 1 : Composition du pétrole du Mer du Nord (NSO)

Tableau 2 : Hormones stéroïdiennes répertoriées chez différents bivalves dans divers tissus.

Chapitre 3 : Métabolisation de la testostérone *in vitro*

***☞* Figures**

- Figure 1 :** Principaux rôles des cytochromes P450 dans le métabolisme des substances endogènes et des xénobiotiques (d'après Wolf., 1986).
- Figure 2 :** Les métabolites de la testostérone avec les différents cytochrome P450 impliqué dans cette métabolisation.
- Figure 3 :** Régio et stéréospécificité du métabolisme de la testostérone par différents isoformes du cytochrome P450.
- Figure 4 :** La Structure microscopique des deux colonnes utilisées : la colonne particulaire et la colonne monolithique.

Une partie des travaux présentés dans ce mémoire a été présentée en congrès soit en communications orales soit en posters

☛ **COMMUNICATIONS ORALES**

- Colloque 2002 ARET a Paris: Perturbateurs endocriniens & effets toxiques
- Test de quelques contaminants de l'environnement en cultures d'hépatocytes de truite arc-en-ciel. **Nadia Aarab**, C. Benneteau, P.Mora & J.F Narbonne
- 2nd colloque of GMRE and the XXXIIème Congrès of GFP 2002 marrakech - Marocco: analysis of the traces, Bioproducts and Quality of the Environnement
- Synthèse de Vitellogénine par des cultures d'hépatocytes de Truites *in vivo*: Evaluation des effets Oestrogéniques de quelques pesticides HAP et PCBs. **Nadia Aarab**, C. Benneteau, P.Mora & J.F Narbonne
- Meeting Biological Effects of Environmental Pollution in Marine Coastal Ecosystems : National Center for Marine Research Athens greece, 7-9 November 2002
- *In vitro* metabolism of testosterone in mussels digestive gland. Improvement of a methodology to detect testosterone metabolites in marine organisms. **Nadia Aarab**, P.Mora, O.Champeau & J.F Narbonne.
- The International Symposium of Malacology, European Society 14-17 jun 2003 Rochelle FRANCE.
- Biochemicals and Histological Responses of Fish and mussels Exposed to Endocrine Disruptors. **N.Aarab**, C.Minier, S.Lemaire, B.D-Cuisset, E.Unruh, P.Hansen, JF.Narbonne & P.Garrigues
Award of the best young scientist

☛ **POSTERS**

- 2^{end} PCB Workshop: Recent Advances in the Environmental Toxicology and Health Effects of PCBs Brno, Czerch Republic 2002
- Estrogenic potency of Phenoclor DP6, PCB congeners and related compounds: *in vitro* vitellogenin synthesis in Rainbow Trout hepatocytes. **Nadia Aarab**, C. Beneteau, P.Mora & J.F Narbonne
- The 12th International Symposium PRIMO, "Pollutant Responses in Marine Organisms" Mai 2003 Floride USA.
- Biochemicals and Histological Responses of Fish and mussels Exposed to Endocrine Disruptors. **N.Aarab**, P.Mora, C.Minier, S.Lemaire, B.D-Cuisset, E.Unruh, P.Hansen, JF.Narbonne & P.Garrigues.

- Proteomic approach for study the effects of cadmium exposure in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*): 2DE gels, SELDI-TOF and MALDI:ESI:TOF. Daniela M. Pampanin, Anne Bjornstad, **Nadia Aarab**, Cristina Nasci, Odd Ketil Andersen & Aldo Viarengo.
- 19th International Symposium on Polycyclic Aromatic Compounds, September 21-25, 2003, Amsterdam, The Netherlands
- Biochemicals and Histological Responses of Fish and mussels Exposed to PAH **N.Aarab**, P.Mora, C.Minier, S.Lemaire, B.D-Cuisset, E.Unruh, P.Hansen, JF.Narbonne & P.Garrigues.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

An	Anthracène
ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
Ac I	Anticorps
Ag	Antigène
ANOVA	Analyse de variance
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ARO	Aroclor 1254
ATB ou TBA	Acide thiobarbiturique ou (thiobarbituric acid)
ATP	Activité microbiologique (dosage de l'adénosine-tri-phosphate)
As	Arsenic
BaA	Benzo[a]anthracène
B[a]P	Benzo[a]pyrène
BCh	Butyrylcholine
BChE	Butyrylcholinestérase
BPH	Benzo[a]pyrène hydroxylase
BSA	Bovine serum albumin (albumine bovine sérique)
CAT	Catalase
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzène
ChE	Cholinestérase
Chrys	Chrysène
CG/SM	Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse
CG/DCE	Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons
CYP	Cytochrome P450
DA	Discriminant analysis (analyse discriminante)
DCNB	1,2-dichloro-4-nitrobenzène ou 3,4-dichloro-1-nitrobenzène
DDE	Dichlorodiphenyldichloroéthylène
DDT	Dichlorodiphenyltrichloroéthane
DES	Diéthylstilbestrol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	DiMéthyl-SulfOxyde
DP₆	Phenoclor
E₂	Oestradiol
ELISA	Ezyme Linked Immuno Sorbant Assay
EROD	7-éthoxyrésorufine-O-déséthylase
EPA	Environmental Protection Agency
FDA	Food and Drug Administration
Fe	Fluorène
Fluo	Fluoranthène
GPX	Glutathion peroxydase
GST	Glutathion S-transférase
GST/CDNB	Activité glutathion S-transférase envers le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène

Abréviations

HAP ou PAH	Hydrocarbure aromatique polycyclique (ou polycyclic aromatic hydrocarbon)
H₂O₂	Peroxydase d'hydrogène
HPLC	High performance liquid chromatography
ICM	Intervalle de confiance de la moyenne
IGS	L'indice gonado-somatique
IP	Indéno(1,2,3-cd)Pyrène
Kda	Kilodaltons
KT	Kétotestostérone (cétotestostérone)
MDA	Malonedialdéhyde
MFO	Mixed-function oxygenase (monooxygénase à fonctions mixtes)
NADH-red.	NADH-cytochrome <i>c</i> (<i>b5</i>) réductase
NSO	North Sea Oil
OCDE	Organisation de Coopération et Développement Economique
OIT	Organisation Internationale du Travail
OMS	Organisation Mondiale de Santé
OPD	Orthophénylène diamine
P450	Cytochrome P450
PCBs	Polychlorobiphényles
PCB77	3,4,3',4' tetrachlorobiphényl
PCB153	2,4,5,2',3',4' hexaclarobiphényl
PChE	Propionylcholinestérase
Phe	Phénanthrène
PISC	Programme International sur la Sécurité des Substances
PM ou MW	Poids moléculaire (ou molecular weight)
PNUE	Programme des Nations Unies pour l'Environnement
Pyr	Pyrène
SHBG	Sex Hormone Binding Globulin
SDS	Sodium dodécyl-sulfate
SOD	Superoxyde dismutase
TBT	Tributylthin
TBARs	l'Acide thiobarbiturique.
TCDD	2,3,7,8-tétrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxine
VTG	Vitellogénine
Zn	Zinc

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

L'écotoxicologie s'est développée au début des années 60 quand se sont manifestés les effets de la contamination de l'environnement par des produits polluants d'origine industrielle ou agricole. C'est, en effet, à cette période que des intoxications dues au mercure, au cadmium ou aux polychlorobiphényles (PCBs) ont touché certaines populations au Japon (1953-1990) (Takisawa, 1970). De même, dans la région des grands lacs américains, on a constaté des effets toxiques dus au DDT chez les oiseaux et les poissons. Enfin, de 1962 jusqu'à présent, plus de 50 accidents concernant des pétroliers ont été recensés dans le monde, chacun entraînant un relargage moyen de 10 000 tonnes de pétrole brut dans la mer, induisant des altérations profondes des écosystèmes marins. Les exemples les plus récents de ces accidents sont le naufrage de l'ERIKA au large des côtes françaises en 1999 et celui du Prestige en 2002 au large des côtes françaises et des côtes espagnoles.

Il est donc apparu important de protéger l'Homme et son environnement en prenant rapidement des mesures d'ordre réglementaire, par exemple l'interdiction ou la limitation de l'usage de certains composés chimiques. Mais pour évaluer les conséquences des mesures réglementaires et être capable d'identifier des contaminations nouvelles, l'organisation d'une surveillance de ces milieux devenait essentielle.

On a donc vu se développer au début des années 70 des programmes de surveillance de l'environnement basés sur l'analyse chimique des contaminants majeurs (hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), polychlorobiphényles (PCB), métaux lourds, pesticides organochlorés) dans différents compartiments de l'environnement (colonne d'eau, sédiments, organismes). Le deuxième volet de la surveillance de l'environnement est basé sur l'observation des changements induits au niveau des populations et des communautés constituant les écosystèmes permettant de typer les biocénoses (Figure 1). Des outils basés sur les paramètres physico-chimiques et biologiques ont donc été développés et ont été mis au service des responsables, publics ou privés, pour évaluer la qualité des milieux. L'ensemble des paramètres mesurés a mis en évidence la sensibilité du milieu aquatique.

La gestion de l'eau vise donc à préserver ou à reconquérir la qualité des milieux aquatiques tout en assurant les besoins en eaux des usagers dans des

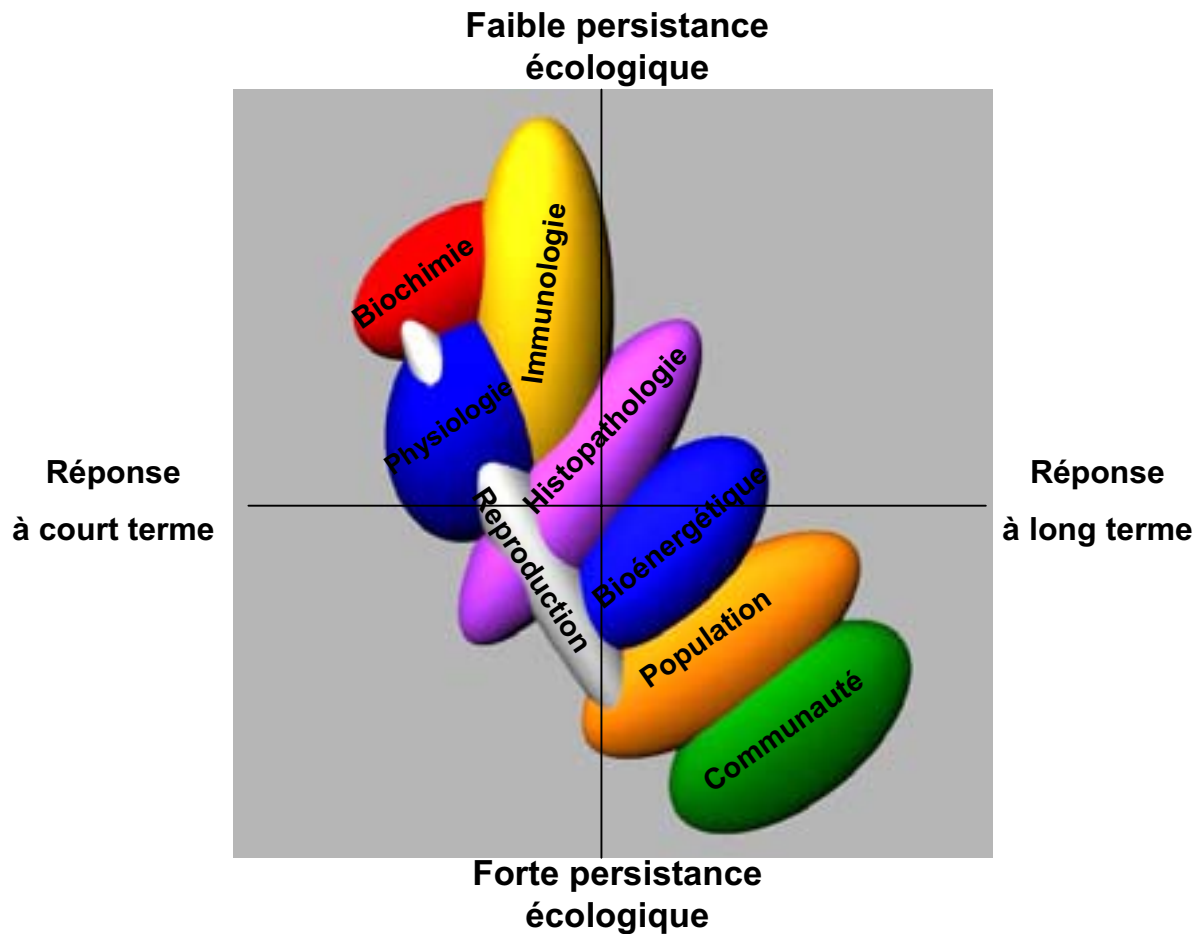


Figure 1: Représentation schématique des différents types de paramètres biomoléculaires, biochimiques, ou physiologiques mesurables à différents niveaux d'organisation de l'individu, la population, la communauté pour l'évaluation de l'état de l'environnement (d'après Adams, 2000)

conditions économiques acceptables. Dans une optique de développement durable les gestionnaires ont besoin d'outils structurés et directement opérationnels. Des réseaux de mesures ont été mis en place en France depuis le début du siècle dans le domaine de la quantité (eau pluie, débits). Leur fonctionnement de façon systématique n'est effectif que depuis les années 70 dans les eaux dulçaquicoles (*Le Réseau National de Bassin*) et dans les milieux côtiers (*Réseau National d'Observation du milieu marin*) (Claisse *et al.*, 1992). Les données collectées par ces réseaux permettent d'évaluer les conditions du milieu, fournissant une aide précieuse pour déterminer les orientations de la gestion des eaux. Ils permettent de vérifier les résultats des différents programmes d'action et d'observer l'évolution du milieu au cours du temps. Si les réseaux de mesures sont indispensables à l'évaluation et au suivi des milieux, les mesures "brutes" qu'ils fournissent sont souvent fastidieuses et délicates à interpréter. L'interprétation de ces mesures doit donc reposer sur des outils adaptés qui permettront de traduire les résultats des observations en indicateurs simples, comme par exemple des niveaux de qualité repérés par des couleurs significatives.

Si ces outils ont commencé à être mis en place au sein des Agences de l'Eau sous la forme des SEQ (*Systèmes d'Evaluation de la Qualité*) depuis les années 90, il reste d'une part à les perfectionner (sensibilité, représentativité, prédictivité...) et d'autre part à en étendre l'usage, en particulier à la surveillance des milieux côtiers.

Notion de biomarqueurs

La surveillance de la contamination chimique dans un écosystème ne permet pas d'évaluer son impact sur les organismes, les populations et les communautés constitutives. La réponse des organismes à la contamination en terme d'effets sublétaux, ne peut être évaluée que par des mesures de paramètres biologiques, physiologiques ou biochimiques (Mc Intyre & Pearce, 1980), selon une approche voisine de celle utilisée pour les diagnostics médicaux en clinique humaine ou vétérinaire. En effet, si l'écologie numérique détecte des modifications dans les communautés d'un écosystème, il est nécessaire de disposer d'indicateurs plus précoces révélant un risque de modification de l'écosystème. Pour développer des indices "cliniques" ou pour évaluer et prédire les atteintes des organismes en cas de contamination de leur environnement, les chercheurs ne disposaient que de bases théoriques succinctes.

La plupart des tests biologiques disponibles en laboratoire pour estimer l'écotoxicité des composés chimiques (dits biotests) étaient limités soit à la toxicité aiguë, soit à des paramètres physiologiques non spécifiques (par exemple, les paramètres sanguins du métabolisme énergétique). Ces paramètres, n'étant pas liés directement à une pathologie cellulaire, n'avaient qu'une faible crédibilité en tant qu'indicateurs de contamination de l'environnement.

A partir des années 70, le 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 possédant un intérêt écotoxicologique comme les oiseaux, les poissons ou les mollusques.

Parmi ces indices biochimiques, l'induction des métallothionéines par certains métaux et des activités monooxygénases liées au cytochrome 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. Ils peuvent donc fournir des indicateurs 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 ; Shigenaga & Ames, 1991; Chipman & Marsh, 1991; Bolognesi *et al.*, 1996; Swendberg, 1996 ; Morin *et al.*, 1998; Akcha *et al.*, 1999, 2003) ou l'immunotoxicité (Vos, 1980 ; Fisher, 1988 ; Auffret *et al.*, 2002) ont été développées.

Deux approches complémentaires sont utilisées de nos jours : la première est basée sur les communautés ou populations, il s'agit notamment des indices biocénétiques, qui de par la présence ou l'absence de telle ou telle espèce, nous renseignent sur l'état de santé d'un milieu (Ramade, 1979), mais malheureusement *a posteriori*. La seconde approche est plus prédictive sur l'état de santé du milieu elle se situe au niveau de l'individu et concerne l'utilisation de biomarqueurs (Figure 2).

Au début des années 80, la notion de **biomarqueur** est apparue et désigne les changements biochimiques, physiologiques et histologiques chez les organismes susceptibles d'être utilisés comme organisme sentinelle pour estimer soit l'exposition à des contaminants, soit les effets induits par la pollution (Lagadic *et al.*, 1997).

La notion de biomarqueur est donc relativement récente et le développement de son utilisation comme outil de surveillance et d'évaluation de l'environnement est étroitement liée à la connaissance des mécanismes moléculaires des processus toxiques chez différentes espèces animales ou végétales appartenant aux différents écosystèmes (Figure 2).

Les biomarqueurs proposés se situent à différents niveaux des mécanismes d'action toxique, allant de la cause aux effets. Les paramètres peuvent se mesurer de la première interaction de l'agent toxique avec un récepteur cellulaire jusqu'aux altérations structurelles et fonctionnelles. Ainsi sont apparues les notions de :

Biomarqueurs d'exposition qui rendent compte de la nature et de l'intensité des entités toxiques biodisponibles dans le milieu. Il sont en général impliqués dans les métabolismes de (dé)toxication des xénobiotiques (ex.: cytochromes P450) ou dans les mécanismes de défense cellulaire (ex.: enzymes antioxydantes). Leurs variations peuvent être spécifiques ou non d'une catégorie de contaminants (ex.: induction chez le poisson du cytochrome P450 CYP1A par les HAPs) et n'entraînent pas obligatoirement d'effets délétères. Elles signifient la plupart du temps que l'organisme s'est adapté à une agression extérieure d'ordre chimique.

Biomarqueurs d'effet qui correspondent à des cibles moléculaires qui, lorsqu'elles sont atteintes, signifient que les mécanismes de défense ou de détoxication de l'organisme n'ont pas été suffisamment efficaces pour contrer l'action néfaste d'un xénobiotique (ex.: indicateurs de stress oxydatif, adduits à l'ADN, perturbation au niveau du cycle reproducteur). Les conséquences peuvent être parfois irréversibles, entraînant à terme la mort de l'animal ou bien une incapacité à se reproduire. De tels effets peuvent par la suite altérer la structure même des populations et donc des écosystèmes. Ils rendent compte de la gravité des atteintes fonctionnelles des organismes et sont prédictifs d'effets sur les communautés et les populations.

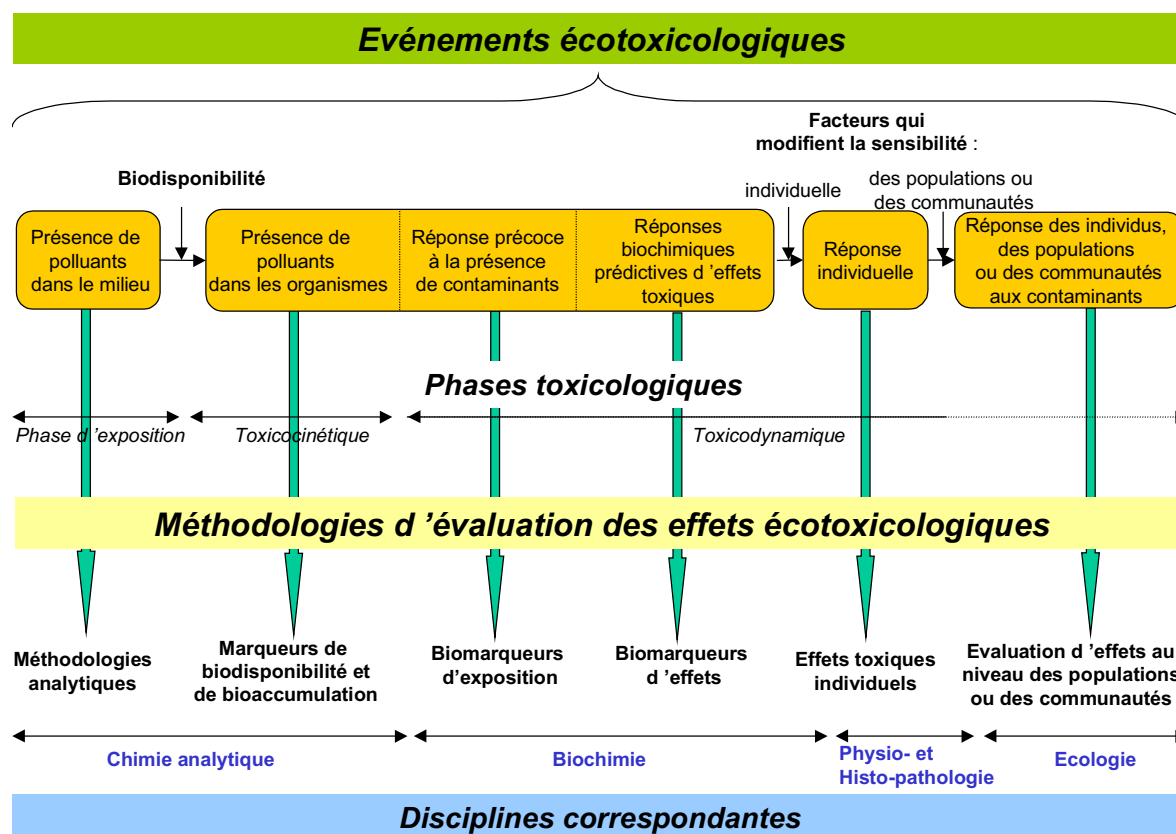


Figure 2 : Représentation des méthodologies permettant d'évaluer les risques écotoxicologiques (modifié d'après un diagramme de Lagadic *et al.*, 1997).

Les **biomarqueurs de susceptibilité** peuvent correspondre à des molécules biologiques comme les protéines qui, lorsqu'elles sont sur-exprimées ou sous-exprimées, augmentent la sensibilité d'un organisme à un contaminant. Ces variations d'expression peuvent être dues à des différences génétiques inter-individuelles ou résulter d'une exposition précédente à un xénobiotique. Par exemple, un individu présentant une sur-expression du cytochrome CYP1A sera plus à même de développer des adduits à l'ADN lorsqu'il sera exposé à des HAPs (synthèse de métabolites hautement réactifs *via* le CYP1A) qu'un individu présentant une expression normale. Par contre, il pourra détoxifier plus efficacement d'autres xénobiotiques (ex.: aflatoxine) et leur sera donc plus résistant (Schlenk, 1999).

Ces outils peuvent être intégrés au sein de la stratégie de surveillance des milieux en complément avec d'autres outils chimiques.

Les organismes aquatiques (point de départ de la plus part des chaînes trophiques) sont les plus exposés à des pollutions multiples qui peuvent engendrer des effets

néfastes sur les milieux naturels et avoir de graves conséquences sur la santé des populations animales et végétales ainsi que la santé humaine.

Les HAP, les PCB, les pesticides et les métaux sont les substances qui ont été les plus recherchées dans les écosystèmes aquatiques (Figure 3). De nombreuses études ont permis de déterminer les effets de ces polluants sur les organismes aquatiques appelés espèces sentinelles, en particulier les poissons pour les vertébrés et les moules pour les invertébrés. Parmi les marqueurs biologiques mesurés, les marqueurs biochimiques et moléculaires revêtent un intérêt particulier de par leur spécificité vis-à-vis de certains contaminants, permettant ainsi la détection de ces produits, qu'une analyse chimique peut confirmer (Figure 3).

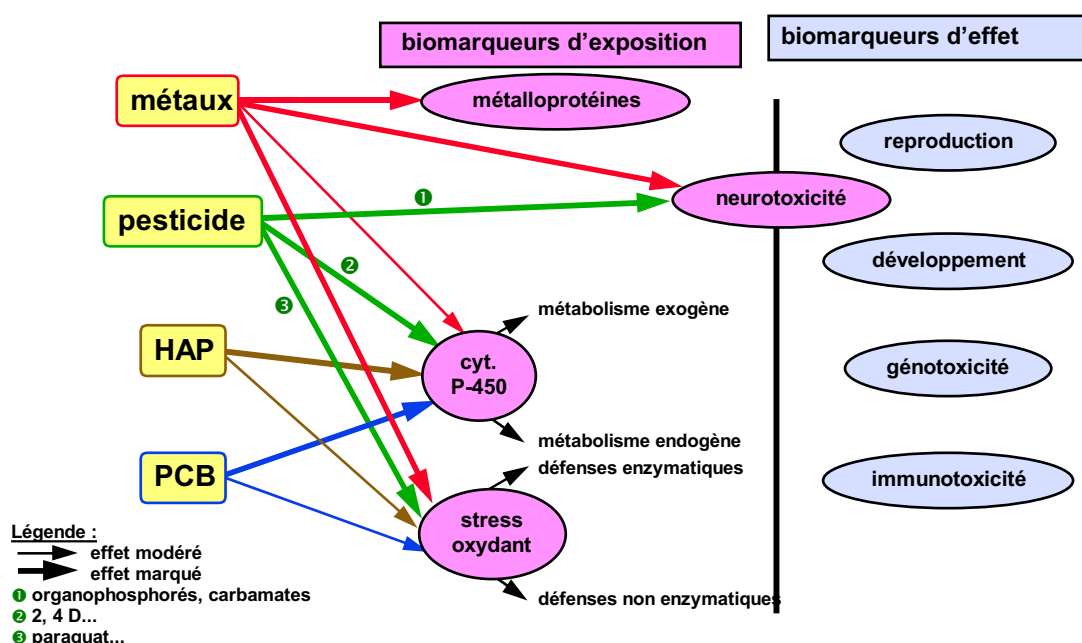


Figure 3. Relations entre les principaux contaminants et les marqueurs biologiques (d'après Narbonne & Michel 1993).

Les biomarqueurs d'exposition témoignent de la présence du contaminant dans 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 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.

Les biomarqueurs d'effets, révèlent l'action des contaminants par la mesure de modification de paramètres biologiques, ces derniers sont très nombreux et variés suivant le niveau biologique considéré (biochimique, cellulaire, physiologique,...).

Enfin, les biomarqueurs ne sont pas seulement limités aux études de 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* »).

Les programmes de surveillance fournissent un nombre considérable de données qui sont rarement disponibles et valorisés. Ces dernières peuvent être très utiles pour les scientifiques, mais assez complexe et difficiles à interpréter pour le législateur et les gestionnaires de l'environnement. Il est donc nécessaire de structurer les programmes de surveillance afin qu'ils puissent délivrer des informations accessibles et utiles facilitant la prise de décision des gestionnaires et des législateurs le cas échéant.

Dans ce cadre, il est important de posséder des outils simples et bien structurés : un indice de pollution qui synthétise les informations apportées facilitera l'interprétation des mesures de marqueurs biochimiques effectuées.

Le programme européen BIOMAR (<http://www.lptc.u-bordeaux1.fr/~carpy/Biomar/Default.htm>) a permis une approche globale multimarqueurs basée sur la mesure de plusieurs biomarqueurs comme diagnostic du niveau de pollution. Cette approche est semblable à celle employée dans le diagnostic des maladies humaines par la mesure des paramètres biochimiques dans le sang. L'approche multimarqueurs utilise une analyse statistique spécifique pour différencier ou caractériser les sites étudiés. Un niveau de pollution élevé ou de faible contamination est comparé aux résultats obtenus avec des dosages chimiques. Elle s'est inspirée dans le principe de l'approche pratiquée par les Agences de l'Eau responsables de la surveillance de l'environnement, qui établit des indices de qualité environnementale en prenant en compte les critères chimiques et biologiques, dans le but de classer les sites surveillés dans une échelle SEQ_{eau} : de légèrement pollués à fortement pollués (dans la majorité des cas on retient 5 niveaux).

Le travail présenté dans ce mémoire porte d'une part sur les biomarqueurs d'exposition et d'autre part sur les biomarqueurs d'effets.

La première partie portera sur l'application des biomarqueurs d'exposition en milieu marin et en milieu dulçaquicole.

- Le premier chapitre expose les résultats des marqueurs biologiques mesurés chez des bivalves marins (*Mytilus galloprovincialis*) prélevés au cours de 5 campagnes de prélèvement en Mer Méditerranéenne sur une période de trois ans dans le cadre du programme européen BEEP (Biological Effects of Environmental Pollution in marine coastal ecosystems) (<http://www.beep.lptc.u-bordeaux1.fr>).
- Le second chapitre concerne l'étude des marqueurs biologiques chez trois espèces sentinelles de poissons d'eau douce, la truite arc-en-ciel, le barbeau et le chevaine, prélevés sur plusieurs sites du Bassin du Sud-Ouest du France en collaboration avec l'Agence de l'Eau d'Adour-Garonne (programme FISHBIO).

La deuxième partie est consacrée à l'étude des biomarqueurs d'effets chez les poissons et les bivalves.

Les résultats seront présentés en trois chapitres dont :

- Le premier chapitre traitera l'évaluation des effets oestrogéniques de quelques contaminants chimiques *in vitro* chez la truite.
- Le deuxième chapitre présentera les résultats d'une étude d'exposition en aquarium de turbot et de moule à des contaminants chimiques (hydrocarbures, détergents)
- Le troisième chapitre portera sur la mise au point et l'optimisation d'une méthode d'analyse de métabolites de testostérone chez les poissons et les bivalves par chromatographie en phase liquide (HPLC).

PARTIE 1 :

**Les biomarqueurs d'exposition :
application à la surveillance
biologique des milieux aquatiques**

CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉS

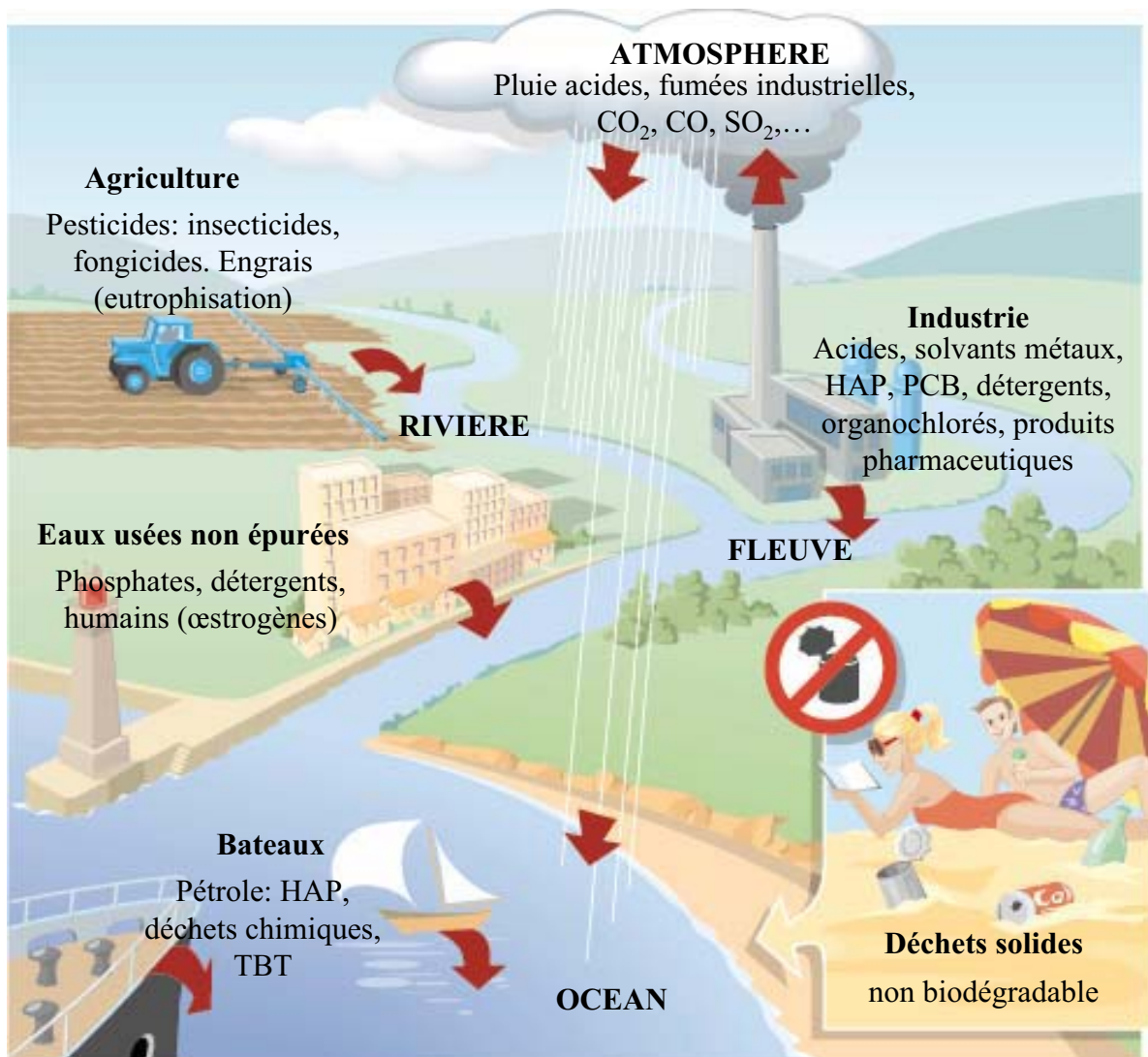


Figure 1: Sources de polluants dans l'environnement

I - LES POLLUANTS ENVIRONNEMENTAUX

Le fort développement de la technologie a donné de nouvelles dimensions aux risques d'intoxication et aujourd'hui le nombre de populations exposées aux contaminants environnementaux ne cesse d'augmenter. On estime à 250 000, le nombre de nouveaux produits chimiques synthétisés qui viennent s'ajouter chaque année aux plus de 2 millions de substances déjà répertoriées. Plus de 100 000 substances sont commercialisées et la plupart se retrouvent dans l'environnement à la fin de leur cycle de vie (Depldege & Fossi 1994).

Les écosystèmes aquatiques représentent d'importants réservoirs de polluants qui se répartissent au niveau des différents compartiments (eau, substrat et organismes). Nous présenterons ici rapidement les principaux types de polluants qui atteignent l'environnement aquatique et leurs origines (Figure 1).

Les contaminants peuvent être classés en deux groupes :

- les composés organiques qui sont représentés par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les polychlorobiphényles (PCB), les polybromobiphényles (PBB), les polychlorodioxines, les polychlorodibenzofuranes et les pesticides.
- les composés inorganiques qui regroupent les métaux et leurs dérivés organiques méthylés (méthylmercure) et les polluants atmosphériques (ozone et chlorofluorocarbone).

Dans notre étude, la détermination des polluants tels que les HAP, les PCB, les métaux et les pesticides dans le milieu naturel sont réalisés à différents niveaux sur le sédiment, l'eau et le poisson.

1 - Les polychlorobiphényles : PCB

Les polychlorobiphényles (PCB) sont des composés aromatiques chlorés (Figure 2). Ils ont été fabriqués et commercialisés pour la première fois en 1929 par la société MONSANTO. Il existe un grand nombre de combinaisons différentes liées au nombre d'atomes de chlore et aux positions qu'ils occupent : 209 composés ou congénères avec des niveaux différents de toxicité (Figure 2).

Les propriétés thermiques, d'isolement électrique et d'ininflammabilité de ces substances ont conduit à leur utilisation comme fluide caloporteur, l'isolation électrique et le refroidissement des transformateurs et condensateurs électriques. Ces liquides sont principalement connus sous le nom commercial de « Pylène ».

Les PCB ont en commun une grande stabilité chimique et physique et une faible biodégradabilité qui expliquent l'accumulation dans les organismes vivants qui se succèdent dans les chaînes alimentaires au bout desquelles se trouve l'espèce humaine (Larry w. Robertson. 2001)

En raison de leur caractère hydrophobe, seules quelques traces sont trouvées dans la phase dissoute. L'empreinte de la contamination par les PCB dans l'eau, différente de celle obtenue dans les sédiments ou les organismes est caractérisée par la prédominance des congénères les plus faiblement chlorés et s'explique par des solubilités différentes pour chacun des congénères (Bonn *et al.*, 1985a). Dans les sédiments ce sont les PCB les plus chlorés que l'on retrouve compte tenu de leur caractère hydrophobe. Par contre au niveau des organismes, ce sont les congénères les plus bioaccumulés qui résistent au métabolisme : il s'agit surtout des composés à quatre, cinq, six ou sept atomes de chlore par molécule contenant les demi-structures 2,5 ; 2,4,5 ; 2,3,4 ou 2,3,4,5 comme les congénères 153,138 et 180.

Les taux de contamination trouvés dans l'environnement ont amené les industriels et les pouvoirs publics à prendre des mesures pour limiter la production et l'emploi de ces substances (PCB). Malgré leur interdiction à partir de 1975, ces composés persistent toujours dans l'environnement (durée de $\frac{1}{2}$ vie de plusieurs années) , ils ont des effets à long terme sur les organismes qui continuent à s'exercer sur des fonctions biologiques diverses (WHO 1993).

Actuellement, les estimations les plus précises font état d'une charge minimale globale en PCB dans les océans de 230,000 tonnes. Dès lors, on peut conclure que la quantité encore en usage aujourd'hui, soit 800,000 tonnes environ, représente 4 fois le total des PCB présents dans l'environnement océanique (Tanabe & Tatsukawa, 1986), sans compter les plusieurs centaines de milliers de tonnes qui sont encore entreposées en attendant d'être détruites (Rapport UNEP 2003).

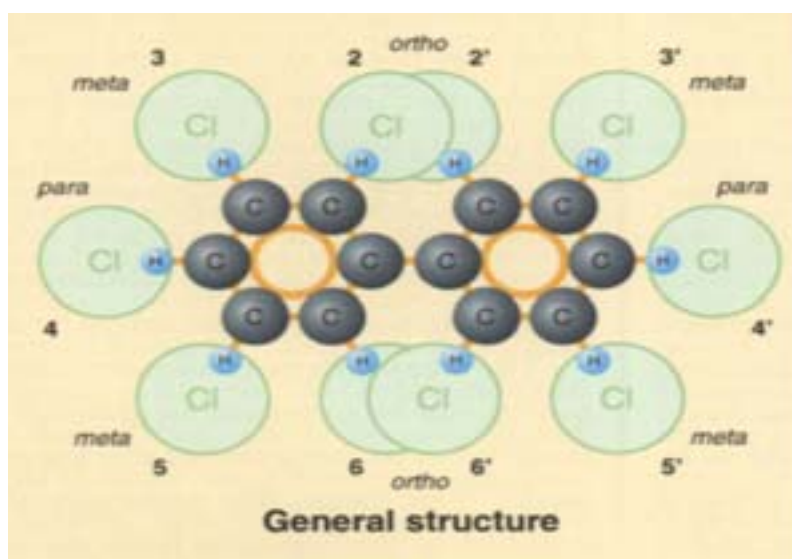


Figure 2: La structure générale des PCB

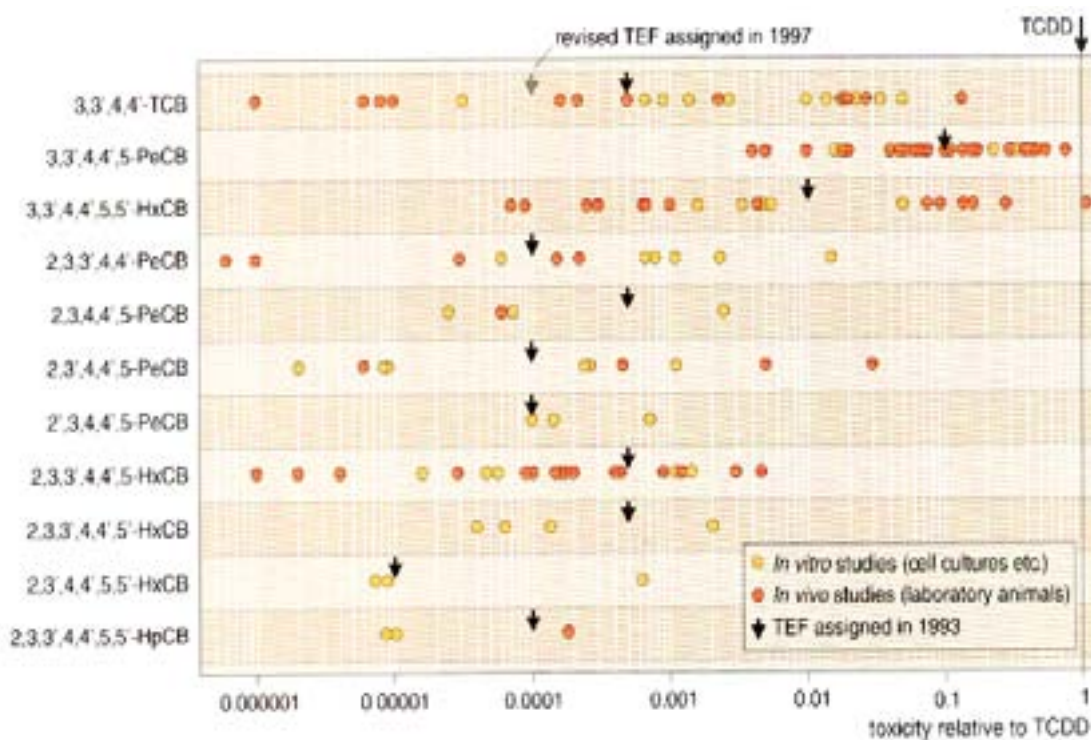


Figure 3: Toxicité de certains congénères des PCB

2 - Les hydrocarbures aromatiques polycycliques : les HAP

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont une famille de composés chimiques constitués d'atome de carbone et d'hydrogène dont la structure des molécules comprend au moins deux cycles aromatiques fusionnés. Les hydrocarbures sont classés en deux groupes : les hydrocarbures saturés (alcanes) et les hydrocarbures aromatiques HAP. La famille des HAP comprend de nombreuses substances qui diffèrent entre elles par le nombre de cycles benzéniques et leur position respective.

Seize HAP ont été retenus par l'Agence pour la Protection de l'Environnement des Etats-Unis (EPA US) comme polluants organiques prioritaires (Keith & Teillard, 1979) et suscitent donc un intérêt particulier dans la surveillance de l'environnement (Figure 4).

Les propriétés physico-chimiques des HAP dépendent de la structure et de la masse moléculaire de ces composés et conditionnent leur distribution dans l'environnement. D'une manière générale les HAP sont peu solubles dans l'eau. La solubilité aqueuse est comprise entre 0,26 et 31000µg/L et elle diminue de façon considérable lorsque le poids moléculaire augmente.

Les sources des HAP dans le milieu marin sont divers (Neff, 1979; McElroy *et al.*, 1989; Parlanti *et al.*, 1990). Ils sont soit formés au cours de la lente maturation de la matière organique, lors de son enfouissement dans les bassins sédimentaires (origine pétrogénique), soit issus de la combustion incomplète à haute température de matières organiques fossiles et récentes (origine pyrolytique). Cette dernière origine peut être liée soit aux activités naturelles (feux de forêts, volcanismes) soit aux activités humaines industrielles. La source majeure de ces composés est cependant liée à l'activité humaine (origine anthropique). Les HAP peuvent pénétrer directement dans le milieu aquatique par des effluents industriels et urbains et par lessivage des sols et de l'atmosphère.

Les HAP sont des composés relativement stables et par conséquent ubiquistes dans l'environnement. Ce sont des substances toxiques qui présentent des propriétés cancérigènes ou mutagènes liées à leurs structures moléculaires. D'après EPA US, parmi les 16 HAP, 7 d'entre eux présentent une activité cancérogène : benzo(a)pyrène, indéno(1,2,3-c,d)pyrène, benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène et chrysène.

Pour les invertébrés marins, la capacité à métaboliser les HAP est variable mais généralement à des taux plus faibles que ceux trouvés chez les vertébrés. Des études *in vitro* ont démontré (Livingstone, 1992, 1994 ; Lemaire *et al.*, 1993) que le métabolisme du BaP dans le foie du flet (*Platichthys flesus*) était approximativement 27 fois plus important que celui trouvé chez les moules, au niveau de la glande digestive. Les dosages des HAP et de leurs métabolites présents dans la vésicule biliaire de poissons, constitue une méthode largement employée pour estimer la contamination du milieu par les HAP, et l'analyse des métabolites biliaires a contribué à la détermination des réactions biochimiques impliquées dans l'élimination de ces contaminants (Hellou & Payne, 1987 ; Krahn *et al.*, 1987 ; Deshpande, 1989).

□

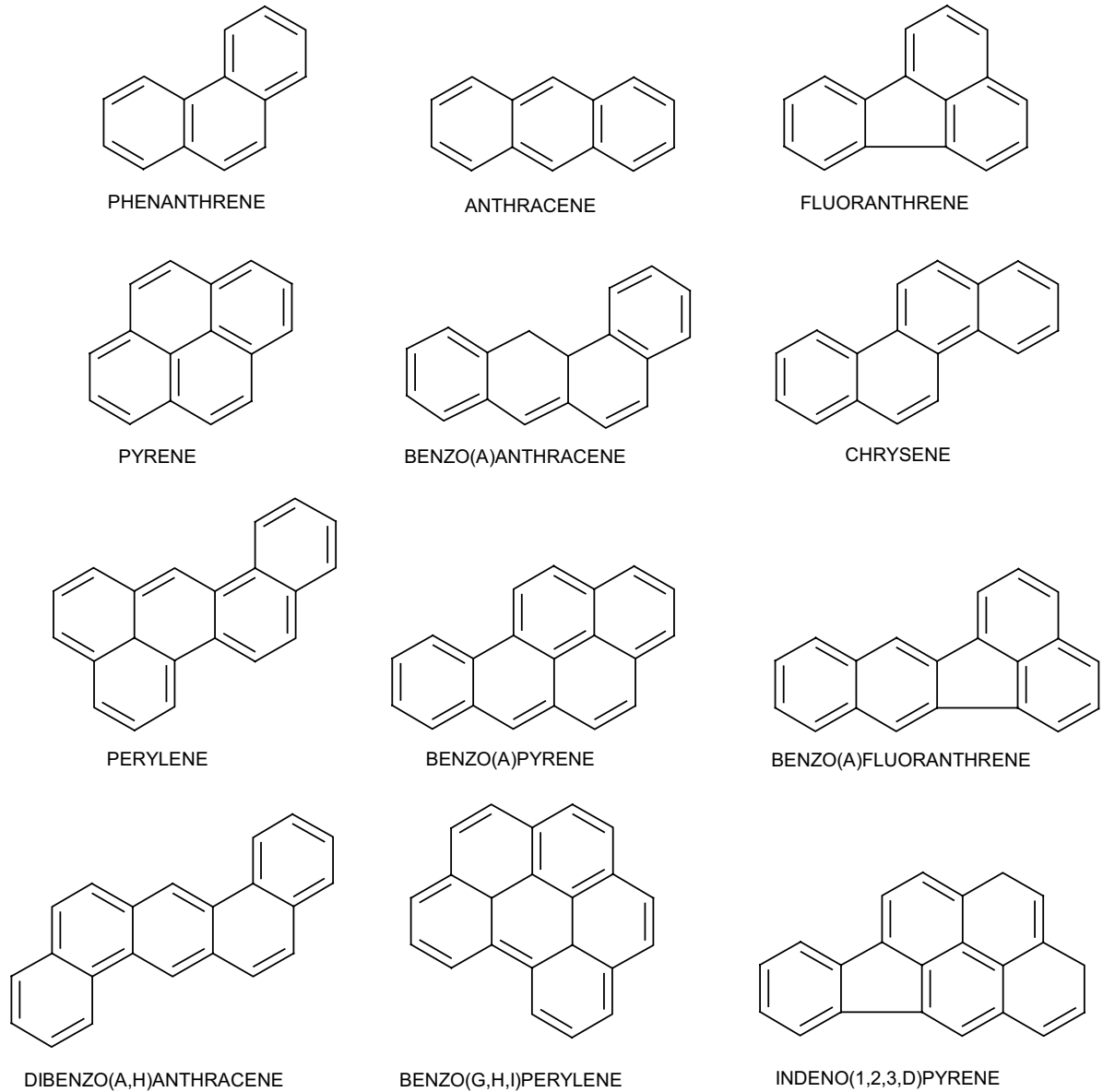


Figure 4 : Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

3 - Les métaux

Les métaux sont des éléments présents à l'état naturel, dispersés dans les roches, les minerais, le sol et l'eau. Le dépassement de la teneur naturelle peut être considéré comme une pollution. Les métaux rencontrés dans l'environnement peuvent être classés selon leur caractère essentiel ou non.

Un métal est considéré comme essentiel si des symptômes pathologiques apparaissent lorsque sa teneur diminue ou qu'il est absent et disparaissent lorsqu'il est rajouté. Il faut aussi que les symptômes soient associés à une défection biochimique (Förstner & Wittmann, 1979). Cependant, un élément essentiel peut également être toxique lorsqu'il est présent à de trop fortes concentrations. Suivant ces critères, 17 métaux sont considérés comme essentiels, dont quatre (Na, K, Ca et Mg) sont présents en grande quantité (supérieurs à 1 mmol.kg⁻¹ de poids frais) alors que les treize autres (As, Cr, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se, Si, Sn, V et Zn) sont présents à l'état de trace (0,001 à 1 mmol.kg⁻¹ de poids frais) ou d'ultra-trace (< 1µmol.kg⁻¹ de poids frais Mason & Jenkins, 1995).

Les métaux non essentiels n'ont aucun rôle biologique actuellement connu. C'est le cas du Hg, Ag, Cd et Pb (Mason & Jenkins, 1995). Ils sont considérés comme néfastes dès qu'ils sont présents dans le milieu et entraînent des effets biologiques délétères à de très faibles concentrations.

Les métaux peuvent être dangereux pour la santé de l'ensemble des populations, en particulier des organismes aquatiques du fait de leur présence dans l'eau au-delà d'un certain seuil de tolérance (à titre d'exemple la catastrophe de Minamata au Japon, en 1953, liée à une pollution des eaux par le mercure, mais également l'important développement de la maladie Itai-Itai au Japon, dans les années 60, en raison d'une contamination des eaux de boisson et du riz par le cadmium). La nocivité des polluants métalliques est liée essentiellement à leur rémanence dans le milieu aquatique.

Les métaux sont présents dans l'environnement sous différentes formes chimiques qui résultent d'équilibres entre les ions métalliques et des complexes organiques et inorganiques. Leur spéciation est un problème fondamental puisque leur disponibilité et leur toxicité dépendront de leurs formes chimiques dans l'eau et dans l'air (fixation aux particules). Les concentrations en métaux ne sont donc pas forcément corrélées aux concentrations mesurées dans les organismes, puisque

seulement une fraction de ces métaux sera disponible pour le biotope. Dans les organismes, les métaux pénètrent sous forme ionique et peuvent se fixer sur de nombreuses molécules biologiques avec une préférence pour celles possédant des groupements thiols (-SH) (Labrot *et al.* , 1996a).

4 - Les pesticides

Les pesticides étymologiquement “tueurs de fléaux” sont des produits obtenus le plus souvent par synthèse chimique. Ils ont été définis par la FAO (Organisation des Nations-Unies pour l’Alimentation) en 1986 comme « toute substance ou mélange de substances utilisé pour la prévention, la destruction ou le contrôle d’un facteur nuisible, incluant les vecteurs de maladies animales ou humaines, les espèces non désirées de plantes qui interfèrent avec la production, la fabrication, le stockage, le transport et la commercialisation des productions alimentaires, agricoles, du bois et de ses dérivés».

D’un point de vue réglementaire, on distingue les pesticides utilisés principalement pour la protection des végétaux que l’on appelle produits phytosanitaires (directive 91/414/CE) ou plus communément produits phytosanitaires, des autres que l’on appelle biocides (définis notamment dans la directive 98/8/CE). Par exemple, un insecticide sera un produit phytosanitaire s’il est utilisé sur du blé mais un biocide dès lors qu’il est utilisé sur du bois de charpente. Parmi les résidus retrouvés dans les eaux lors des contrôles sanitaires ou de la surveillance environnementale de la qualité des eaux, les pesticides incluent tous les produits permettant de lutter contre les organismes nuisibles, qu’ils soient utilisés en agriculture ou non. La France est le troisième utilisateur mondial de produits phytosanitaires après les Etats-Unis et le Japon (environ 100 000 tonnes/an) et le premier consommateur européen (ACTA 1990). Cela représente une moyenne de 5kg de pesticides par hectare et par an.

L’arrivée de ces polluants dans l’environnement marin et les perturbations qui peuvent en résulter ont fait prendre conscience de la nécessité d’actions de surveillance visant à évaluer les niveaux de contamination et permettant, à moyen terme, de dégrader les tendances de l’évolution de la contamination du milieu et de l’état de santé des organismes qui y vivent. 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. Certains de ces insecticides sont des inhibiteurs de l’acétylcholinestérase (AChE) substances neurotransmetteuse du système nerveux. L’AChE est une enzyme impliquée dans

l'hydrolyse de l'acétylcholine. L'acétylcholine est un médiateur synaptique présent dans le système nerveux des mammifères et des insectes, qui déclenche la transmission de l'influx nerveux. Parmi ces pesticides, les carbamates agissent par carbamylation de l'enzyme (Reiner & Aldridge, 1967). Cette inhibition peut entraîner des effets toxiques chez l'homme et les animaux pouvant aller jusqu'à l'arrêt de la respiration et la mort (WHO 1986).

II - LES RÉACTIONS DE BIOTRANSFORMATION

Certaines substances **xénobiotiques** possèdent un caractère lipophile. Cette lipophilie leur confère la double capacité de franchir aisément l'ensemble des membranes cellulaires (épithélium intestinal, paroi vasculaire, membrane des cellules des organes cibles, épithélium des tubules rénaux,...) et d'être éventuellement stockées dans les structures lipidiques. En revanche, ces substances exogènes hydrophobes sont difficilement éliminées de l'organisme car les voies d'élimination (biliaire, rénale,...) utilisent un milieu aqueux.

Dans la quasi-totalité des cellules, il existe des systèmes enzymatiques prenant en charge le métabolisme (généralement oxydatif) de multiples composés liposolubles endogènes (hormones, acides gras, cholestérol, vitamines,...). Cette fonction enzymatique porte le nom de **biotransformation**. Ces systèmes enzymatiques prennent également en charge les xénobiotiques dans le but d'augmenter leur hydrosolubilité afin de faciliter leur excrétion dans les fluides biologiques (urine, bile, sueur,...).

Deux types de réactions interagissent dans le mécanisme de la biotransformation (Tableau 1). Les réactions dites de **phase I**, localisées essentiellement au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, ont pour but de fixer un groupement fonctionnel à la molécule initiale. Le métabolite produit, rendu plus hydrosoluble, peut alors être pris en charge par les réactions de **phase II**. Ces dernières conjuguent le substrat fonctionnalisé à une petite molécule endogène (acide glucuronique, glutathion, sulfate, groupement méthyl,...).

Réaction		Enzyme	Substrat
Phase I	Oxydation □	Cytochrome P450 ou MFO système	Large spectre de substrats à caractère hydrophobe
		Monooxygénase à flavine microsomique	Amines, thiols, thiourés,...
	Réduction	P450, P450 réductase, DT-diaphorase	Vaste spectre comprenant des quinones, des hydrocarbures halogénés,...
	Hydratation	Epoxyde Hydrolase	Epoxydes
Phase II	Glucuronidation	UDP-glucuronyltransférase (UDPGT)	Phénols, amines, thiols
	Sulfatation	Sulfotransférases	Phénols
	Conjugaison au glutathion	Glutathion-S-transférase (GST)	Epoxydes, alcanes et aromatiques halogénés

Tableau 1: Les principales enzymes et réactions des phases I et II (d'après Livingstone, 1991). Les activités utilisées comme marqueur biochimique sont en gras.

La fonction de biotransformation correspond à une fonction biologique de défense de l'organisme et à ce titre elle est bénéfique. On parle ainsi de **détoxication**. Cependant, au cours des étapes de phases I et II, il peut se former des métabolites plus réactifs que la molécule initiale et potentiellement toxique pour la cellule. On désigne ce phénomène sous le terme de **toxication**. Ces métabolites actifs sont des électrophiles puissants qui vont pouvoir interagir avec les macromolécules cellulaires produisant ainsi des nécroses dans le cas des protéines et des lipides, ou des mutations éventuelles dans le cas d'interactions avec les acides nucléiques. Ces mutations peuvent être responsables de la phase d'initiation de la cancérisation.

Chez la plupart des mammifères, les deux voies majeures de conjugaison sont la glucuroconjugaison et la sulfoconjugaison. Toutefois, la glucuroconjugaison peut représenter jusqu'à 70% des réactions de phase II (Tableau 2). Les différents groupements conjuguants interviennent sous forme nucléotidique activée. La localisation hépatique est de loin la plus importante, bien que d'autres tissus puissent être le siège de conjugaisons (rein, intestin, peau,...). Au

niveau cellulaire, les enzymes responsables de ces réactions sont pour la plupart localisées dans la fraction cytosolique.

Types de conjugaison	Forme activée du groupement conjugué	Substrats	Localisations principales	Importance
Gluko-conjugaison	Acide glucuronique : UDPGA	Alcools, phénols, amines, thiols, acides carboxyliques	foie, intestin, peau	+++
	(Acide Glucuronique Uridine Diphosphate)			
Sulfo-conjugaison	Sulfate : PAPS	Alcools, phénols, amines	foie	++
	(Phospho-Adénosine Phospho-sulfate)			
Acétylation	Groupe acétyl : acétyl CoA	Amines aromatiques	foie, rein	++
Méthylation	Groupe méthyl : S-adenosylméthionine	Phénols, amines	foie	+
Conjugaison au	Glycine : gluthation	Epoxydes, alcanes, acides aromatiques halogénés	foie	+

Tableau 2 : Principales réactions de phase II (d'après Livingstone, 1991).

Dans le cas des xénobiotiques, le rôle du cytochrome (CYP450) est d'introduire un groupement fonctionnel sur la molécule (-OH, -NH₂, -SH, -COOH,...) afin d'en préparer la conjugaison pour pouvoir l'excréter (Nebert et Gonzales 1987 ; Nelson et Strobel, 1987 ; Guengerich, 1988 ; Lindmood, 1991). Le CYP450 est aussi impliqué dans la métabolisation endogène. Cela comprend des réactions d'hydroxylation du cholestérol, des stéroïdes, des vitamines D et A, d'alcanes et d'acides gras. Le P450 est une hémoprotéine possédant au niveau du site catalytique un noyau protoporphyrine à atome de fer central. Le cycle catalytique du P450 est schématisé dans la figure 5.

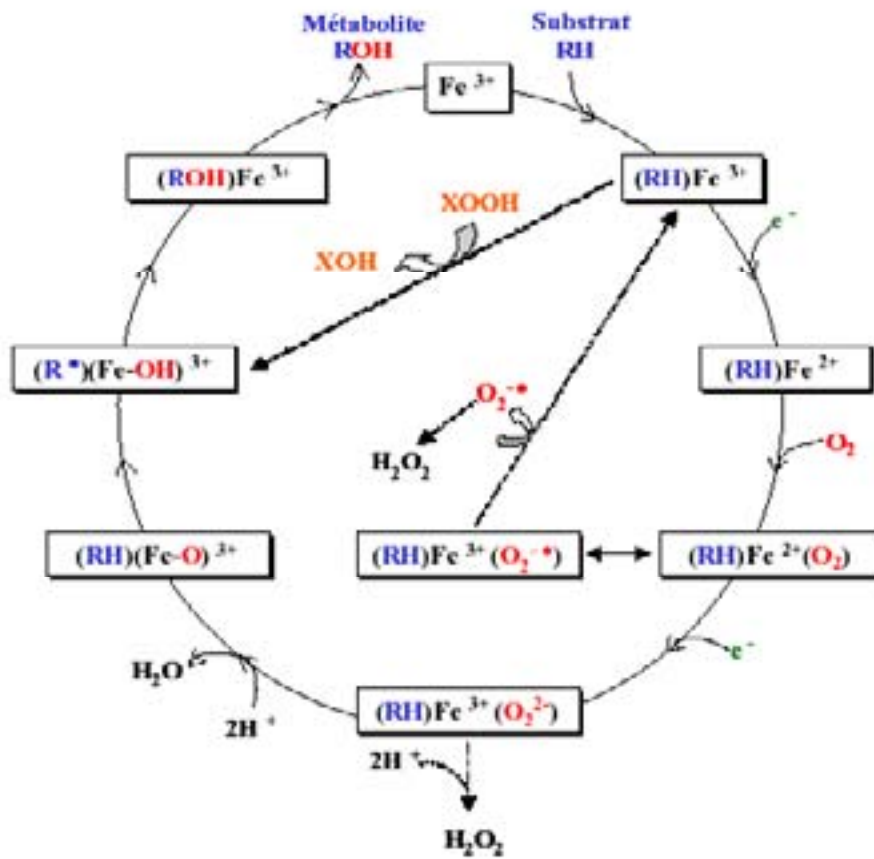


Figure 5 : Cycle catalytique du cytochrome P450 (d'après Halkier, 1996).

III - LES BIOMARQUEURS UTILISÉS

1 - Acétylcholinestérase (AChE)

Par définition, les cholinestérases (ChE) sont des enzymes qui catalysent préférentiellement les réactions d'hydrolyse des esters de choline. Les ChE sont divisées en deux groupes : (1) les acétylcholinestérases (AChE) qui hydrolysent les esters acétiques de choline, (2) les pseudo-cholinestérases qui hydrolysent préférentiellement les esters butyriques, propioniques ou succiniques de la choline.

Le rôle le plus connu de l'acétylcholine (ACh) est sans doute celui qu'elle joue dans la transmission cholinergique de l'influx nerveux chez les vertébrés. En effet, au niveau des boutons synaptiques, après le passage d'un potentiel d'action, la membrane post-synaptique est rapidement repolarisée pour qu'un signal puisse de nouveau passer. Pour ce faire, le neurotransmetteur, ici l'ACh, doit être rapidement détruit. C'est à ce niveau qu'intervient l'AChE qui en hydrolysant l'ACh provoque ainsi la fin du signal et la libération des récepteurs post-synaptiques. Les principaux inhibiteurs des cholinestérases sont les inhibiteurs "organiques" d'origine anthropique : les pesticides organophosphorés qui inhibent de façon irréversible l'activité de l'AChE et les carbamates qui l'inhibent de façon réversible.

L'AChE présente chez les vertébrés un polymorphisme moléculaire important, polymorphisme qui résulte de différentes associations de la même sous-unité catalytique mais aussi de la nature de l'ancrage de l'enzyme aux structures synaptiques. Par contre chez les invertébrés, seules les formes globulaires composées de monomères, dimères et trimères de l'unité catalytique ont été identifiées. L'inhibition de cette enzyme par de nombreux neurotoxiques entraîne une accumulation du médiateur chimique, l'acétylcholine, dans l'espace synaptique, qui maintient de ce fait une transmission permanente de l'influx nerveux, conduisant à la mort de l'individu (Bocquené, 1996).

Parmi les composés neurotoxiques, les insecticides organophosphorés et les carbamates sont considérés comme les plus puissants inhibiteurs spécifiques de cholinestérase. Mais des mélanges d'hydrocarbures ont été aussi cités comme déprimant l'activité de l'AChE (Payne *et al.*, 1996). Des études *in vitro* et *in vivo* menées sur des mammifères, des poissons ou des invertébrés ont relevé une inhibition de l'AChE par des métaux, parmi lesquels le cadmium (Schmidt & Ibrahim, 1994 ; Labrot *et al.*, 1996).

2 - Ethoxyrésorufine O-dééthylase (EROD)

L'éthoxyrésorufine O-dééthylase (EROD) est une monooxygénase qui répond aux inducteurs de type 3-méthylcholanthrène et qui est très utilisée dans la surveillance de l'environnement lors de contamination supposée par des xénobiotiques de types HAP (Fouremant *et al.*, 1984; Addison & Edwards, 1988; Payne *et al.*, 1988; Stegeman *et al.*, 1987 ; Burgeot *et al.* ; 1994). Lindstrom-Seppa (1988) cite l'EROD comme étant un excellent indicateur biologique dans les cas de pollution pétrolière. Certains auteurs estiment que l'EROD est la MFO (mixed function oxidase) présentant la plus forte réponse aux inductions (Andersson *et al.*, 1985a, James *et al.*, 1988).

L'EROD réagit avec un bon nombre de composés organiques nocifs présentant un caractère lipophile qui leur permet de s'accumuler au sein des réserves lipidiques des organismes et dans les membranes cellulaires (essentiellement constituées de phospholipides). La présence de telles molécules entraîne rapidement la mise en route des systèmes biochimiques de détoxification dont le rôle est de rendre hydrosolubles ces composés dangereux, afin de faciliter leur excrétion par voie rénale, biliaire ou branchiale.

Certains organes contiennent des enzymes chargées de catalyser une série de réactions permettant de détoxifier à la fois des drogues et des composés nocifs présents dans l'organisme. La plus étudiée de ces réactions de détoxification est catalysée par une famille d'enzymes appelées cytochromes P450 (CYP450). Depuis des vingtaines d'années, la mesure d'activités monooxygénases, pour identifier des zones de pollution dans l'environnement aquatiques, a été largement utilisée. Des inductions élevées dans les foies de poissons ont été observées au niveau des zones affectées par des déversements de pétrole (Payne & Penrose, 1995 ; Davies *et al.*, 1984).

De nombreuses synthèses bibliographiques témoignent des études réalisées sur les CYP450 et leur potentialité en tant que marqueurs de contamination par les HAP et les PCB (Payne *et al.*, 1987, Goksoyr *et al.*, 1992, Stegeman *et al.*, 1992, Burgeot *et al.* ; 1994 ; Bucheli *et al.*, 1995, Flammarion 1997, Van der Oost, 1997). Après plusieurs années d'expérimentations, l'activité EROD est actuellement envisagée comme outil de surveillance au sein du Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin (RNO), par l'IFREMER. Au niveau européen également, pour le milieu marin, les activités EROD et BPH faisaient partie de la batterie de biomarqueurs utilisés dans le programme européen « Biological Markers of

environmental contamination in marine ecosystem BIOMAR (1995-1998) et sont encore très présents dans le programme BEEP « Biological Effects of Environmental Pollution in marine coastal ecosystems » (2001-2003) lui faisant suite, en tant que biomarqueurs validés (Garrigues *et al.* 2000). Elle est en cours de normalisation chez les poissons marins et d'eau douce au niveau de l'Agence Française de Normalisation (AFNOR).

En ce qui concerne les poissons, de manière générale il semble que l'activité EROD des cyprinidés soit moins inductible que celle des salmonidés (Flammarion 1997). De plus, une forte relation a été observée avec les concentrations en polychlorobiphényles (PCB) dans les tissus, ce qui semblerait indiquer une plus grande sensibilité aux PCB plutôt qu'aux HAP (Flammarion 1997).

Tableau 3 : Induction de l'activité EROD mesurée sur quelques espèces de poissons d'eau douce exposées à des contaminations chimiques *in situ*.

Sites	Contamination identifiée	Période d'échantillonnage	Espèces	EROD S. référence	EROD S. contaminés	Induction	Auteurs
Fleuve Rhône (France)	PCB dans le poisson	printemps	<i>Chondrostoma nasus</i> *	36	36	oui (X 6 à 9)	Monod <i>et al.</i> , 1988
			<i>Rutilus rutilus</i> *	7	52		
			<i>Thymallus thymallus</i> #	76-136	480		
Fleuve Rhône (France)	PCB dans le poisson	mars, juin novembre	<i>Chondrostoma nasus</i> *	6-60(mâles) 3-60 (femelles)	20-100 (mâles) 10-110(femelles)	oui (X 2 à 5)	Masfarauud <i>et al.</i> , 1990
Lac Saima (Finlande)	Effluent traité (pâte à papier) blanchi ou chloré	septembre-octobre (post-frai)	<i>Perca fluviatilis</i> §		12-43	oui	Lindstrôme-Seppa et Oikari. 1990
			<i>Rutilus rutilus</i> *	0,3-0,8	37-50		
			<i>Abramis brama</i> *	7,7	37-50		
Rivière Durance (France)	Effluent chimique organochlorés dont DDT, PCB dans les bryophytes	octobre, février mai	<i>Chondrostoma nasus</i> * <i>Leuciscus cephalus</i> * <i>Barbarus barbarus</i> *	30-48 12-29 11-27		oui (X6 à20)	Vindimian <i>et al.</i> , 1991
Lac Coleman (Australie)	Effluent traité (pâte à papier) AOX (eau) EOX (sédiment) PCDD/TCDD (muscle)	août	<i>Cyprinus carpio</i> * mâle et femelles	4,6 10 ³ à 6 10 ³	à 31 10 ³	oui (X3 à 6)	Ahokas <i>et al.</i> , 1994
Lacs Gaasperplas et Nieuwe Meer (Pays-Bas)	HAP,PCB,OC dans les sédiment et les poissons	décembre	<i>Rutilus rutilus</i> * femelles	1,3	1,6	non	Van der Oost <i>et al.</i> , 1994
Lac Kallavesi (Finlande)	Effluent traité de pâte à papier non blanchie	janv-fev avril, juin,sep-oct	<i>Perca fluviatilis</i> § mâle et femelles	27 (hiver) à 16 (été)	36 (hiver) à 45 (été)	oui (X1,9à 2,9)	Huuskonen <i>et al.</i> , 1995

EROD en pmol/min/mg. * Cyprinidés, § Percidés et # Salmonidés

Tableau 4 : Relation concentration-réponse observée *in situ* chez les différents poissons d'eau douce.

Inducteur	Compartiment	Espèces	Concentration	Unité	EROD (pmol/min/mg)	Correlation EROD/Dose (r ²)	Auteurs
PCB	muscle	<i>Chondrostoma nasus</i> *	0,9-4,5	mg/Kg frais	4-36	0,88	Monod <i>et al</i> 1988
		<i>Rutilus rutilus</i> *	1,6-5,3		7-52		
AOX	Eau	<i>Cyprinus carpio</i> *	300-400	µg/l	5 000-35 000	0,93	Ahokas <i>et al</i> 1994
TCDD	Muscle		1,4	pg/g sec	5 000-35 000	0,88	
HAP	sédiment	<i>Pleuronectes americanus</i>	7-200	µg/g sec	300-2 000	0,98	Vignier <i>et al</i> 1994
PCB	sédiment	<i>Anguilla anguilla</i>	0,1-0,9	µg/g sec	128-238		Van der Oost <i>et al</i> 1991
HAP			25-128	carbone			
OC			0,05-0,2	organique			
PCB	muscle	<i>Anguilla anguilla</i>	2,0-1,3	µg/g lipides	128-238	corrélation +	Van der Oost <i>et al</i> 1991
HAP			2,4-1,8				
OC			1,4-8				
PCB	muscle	<i>Rutilus rutilus</i> *	1,4-5,7	µg/g lipides	0,6-3,5	corrélation +	Van der Oost <i>et al</i> 1991
HAP			3,3-1,9				
OC			0,7-0,3				
PCB	sédiment	<i>Rutilus rutilus</i> *	0,1-0,8	µg/g sec	1,6-2,0	Pas d'induction EROD	Van der Oost <i>et al</i>
HAP			15-80	carbone			
OC			0,08-0,4	organique			
PCB	muscle	<i>Rutilus rutilus</i> *	2,5-7,0	µg/g lipides	1,6-2,0	Pas d'induction EROD	1994
HAP			4,0-3,0				
OC			0,5-1,3				

* Cyprinidés

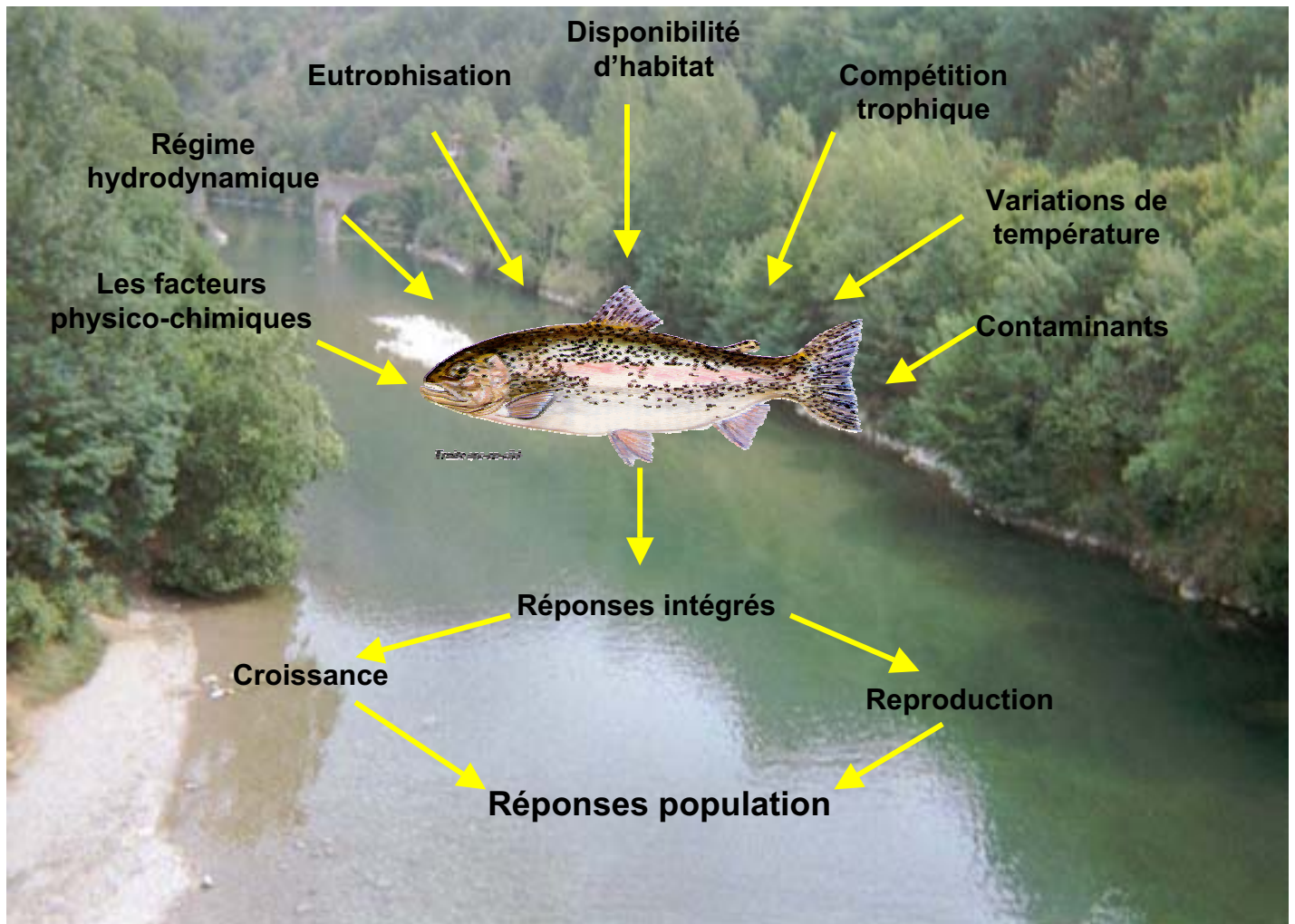


Figure 6: Fluctuations naturelles d'un écosystème.

En ce qui concerne les mollusques, la situation est différente. En effet il ne semble pas y avoir d'activité EROD chez ces derniers bien que l'existence d'une activité BPH ait été rapportée et ait fait l'objet d'études récentes. De plus, les taux d'induction observés sont très inférieurs à ceux mesurés en moyenne chez les poissons, avec des valeurs très rarement supérieures à 3, ce qui laisse présager une faible sensibilité de ces mollusques dont le métabolisme de base des CYP450 reste inférieur au niveau des poissons et pour lesquels les mécanismes sont moins bien connus.

Les activités EROD mesurées chez des poissons, provenant de sites identifiés par les auteurs comme constituant des sites de référence sont rapportées dans le Tableau 1. Ces activités mesurées sur une même espèce, montrent des variations parfois importantes qui sont dues, soit à des mesures effectuées dans des stations de référence différentes (pour un même auteur) (Monod *et al.*, 1988. ; Lind-Seppa et Oikari, 1990 ; Vindimian *et al.*, 1991 ; Ahokas *et al.*, 1994), soit à des périodes d'échantillonnage différentes d'une étude à une autre (Masfaraud *et al.*, 1990), soit à différentes méthodes utilisées.

Dans ces exemples, seuls Van der Oost *et al.* (1994) ne mettent pas en évidence d'induction significative de l'activité EROD en relation avec le gradient de contamination par les PCB, les HAP et les organochlorés (Tableau 4) mesurés dans les sédiments et les poissons (gardons) de deux lacs étudiés. Et ceci contrairement aux résultats qu'ils avaient obtenus en 1991 sur les mêmes sites

Chez les poissons, le taux d'induction de cytochromes P450 de la famille 1A dans le foie est utilisé comme indice principal d'exposition des organismes à des polluants de type HAP (notamment le benzo[a]pyrène) et les PCB planaires (Tableau 4).

Bien que la pollution soit le facteur qui explique l'essentiel de la variation d'activité observée entre les organismes provenant de sites de référence et de sites contaminés, d'autres facteurs, tels que le sexe, l'espèce, la saison, doivent être pris en compte pour l'interprétation des résultats. D'autre part il ne faut pas exclure les fluctuations naturelles des écosystèmes et les variations de température du milieu (Figure 6)

3 - L'activité Benzo(a)pyrène Hydroxylase chez la moule

L'activité BPH a été développée chez les vertébrés puis chez les invertébrés. Les connaissances acquises ont par la suite été appliquées à la surveillance du milieu

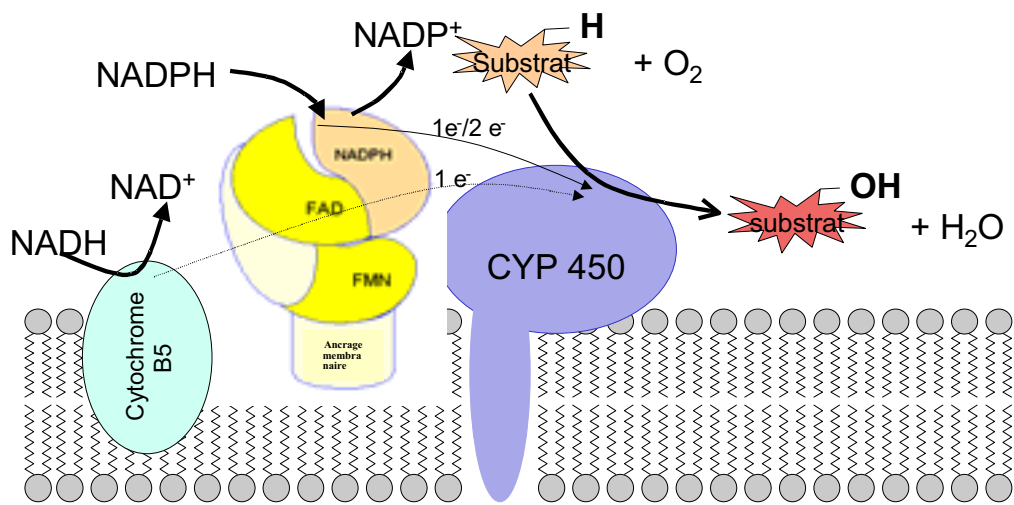


Figure 7 : Rôle du cytochrome B5 et du complexe CRP (cytochrome p450 réductase) dans le fonctionnement des CYP450. Les 2 électrons et protons nécessaires

marin. Les capacités d'adaptation des moules exposées aux HAPs peuvent être estimées à partir des variations d'activités enzymatiques telle que la BPH, utilisées comme biomarqueurs de détoxication.

Le dosage *in vitro* de l'activité BPH ne reflète pas systématiquement l'activité du P450 *in vivo*. Cette activité est cependant très utile comme biomarqueur d'exposition aux HAP. L'activité prend place dans le cadre de la phase de fonctionnalisation. Les cytochromes P450 et leurs réductases respectives (NADPH cytochrome P450 réductase) forment un complexe multienzymatique enchassé dans la bicouche lipidique du réticulum endoplasmique (Figure 7) (microsomes pour les fractions subcellulaires). Ce complexe est aussi présent dans les mitochondries et le noyau. Le processus permettant la métabolisation du B(a)P en 3OH-B(a)P et la détoxication des HAPs en composés diols notamment en facilitant ainsi leur excrétion, se déroule au niveau de la glande digestive chez la moule.

En effet une étude a montré leur présence dans les microsomes de glandes digestives (Peters,1998). Les isoformes des cytochromes P450 responsables de l'activité BPH n'ont pas encore été identifiées chez les mollusques, mais il semblerait qu'elle soient homologues aux isoformes CYP4501A1 des vertébrés, qui ont la particularité d'être spécifiquement induites par les HAP planaires (Mora *et al.*, 1999). Chez les mammifères, les enzymes transformant les HAP, les oxygénases à fonction multiple (MFO), peuvent intervenir dans l'initiation des tumeurs et peuvent ainsi servir d'inducteur de la contamination des animaux par des cancérogènes et autres polluants. Ces enzymes ont des rôles semblables dans l'activation de pro-cancérogènes chez les vertébrés marins et aussi chez les invertébrés marins tel que la moule (Anderson & Doôs, 1983).

L'induction des activités MFO chez les organismes marins peut indiquer une exposition aux HAP, PCB et autres polluants. Des inductions de MFO dépendantes ont été observées chez des organismes provenant de sites contaminés par des hydrocarbures (Garrigues *et al.*, 1990 ; Van Veld *et al.*, 1990 ; Narbonne *et al.* , 1991 ; Collier *et al.* ;1992).

4 - Glutathion-S-transférase (GST)

Les glutathions S-transférases (GST) sont des enzymes de métabolisation, dont la fonction est de conjuguer à une molécule de glutathion (qui possède un groupement nucléophile -SH) une grande variété de substrats (porteurs de groupements électrophiles) pour permettre leur élimination. Ce sont donc des enzymes de la phase II du métabolisme des xénobiotiques. Pendant cette phase II ou

phase de conjugaison, les métabolites des xénobiotiques, déjà rendus moins hydrophobes par les réactions d'oxydation ou d'hydroxylation de la phase I, sont transformés en substances encore plus hydrosolubles. Ils sont donc d'autant plus facilement excrétés. La phase de conjugaison concerne aussi bien des molécules endogènes que des xénobiotiques comme les PCB, les HAP et les pesticides. L'efficacité des GST est due au fait qu'un grand nombre de composés exogènes et endogènes ont les caractéristiques requises pour constituer un substrat approprié.

Ces enzymes sont généralement solubles (cytosoliques) et présentes sous plusieurs isoformes, dont certaines sont inductibles par les contaminants qu'elles rendent moins toxiques. Cette particularité en a fait une activité intéressante en tant que marqueur biochimique. Les GST ont été mises en évidence dans la plupart des êtres vivants tels que la levure (Foley & Sheehan, 1998), les mollusques (Fitzpatrick & Sheehan, 1993; Fitzpatrick *et al.*, 1995a; Blanchette & Singh, 1999), les vers de terre (Stenersen *et al.*, 1979, Borgeraas *et al.*, 1996), les crustacés (Keeran & Lee, 1987; Leblanc & Cochrane, 1987), les insectes (Stenersen *et al.*, 1987; Prapanthadara *et al.*, 1996), les poissons (George & Young, 1988; Martínez-Lara *et al.*, 1997; Pérez-López *et al.*, 2000), les mammifères (Habig *et al.*, 1974; Kamisaka *et al.*, 1975; Rouimi *et al.*, 1996; Bolton & Ahokas, 1997) et les plantes (Pascal *et al.*, 1998; Hong *et al.*, 1999).

Bien que nos connaissances sur ces enzymes chez les poissons soient encore peu abondantes, leur intérêt en tant que biomarqueurs de contamination par les contaminants de type HAP, PCB et pesticides dans les milieux marins et dulçaquicole a été démontré (Boryslawskyj *et al.*, 1988, Narbonne, 1991).

5 - Catalase (CAT)

Les catalases sont des hémoprotéines tétramériques qui, avec un atome de fer par sous-unité, ont une masse d'environ 240 KDa. Elles catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène moléculaire. Les catalases sont des enzymes peroxysomales dont le rôle est de prévenir les peroxydations des molécules biologiques induites par l'eau oxygénée (H_2O_2). Les catalases sont présentes dans tout le règne animal et se retrouvent aussi chez les végétaux. Elles sont sensibles à certains contaminants inducteurs de stress oxydatif au niveau des membranes cellulaires, comme les HAP, PCB ou certains pesticides (Livingstone, 1993) et les métaux (Labrot *et al.*, 1996a). Cependant, les résultats sont parfois contradictoires *in vivo*, certains auteurs montrent une induction de l'activité (Di Giulio *et al.*, 1989 et 1993), d'autres une inhibition (Labrot *et al.*, 1996a). Une des hypothèses retenue est que cette activité enzymatique serait très sensible aux

facteurs environnementaux d'origine anthropique ou naturelle (Pellerin-Massicote, 1994) et pourrait résulter d'un équilibre fragile entre induction et inhibition par les composés à cycle redox.

Les principaux systèmes de défense antioxydante ont été mis en évidence chez les invertébrés aquatiques (Winston & Di Giulio, 1991; Lemaire & Livingstone, 1993). En particulier, chez la moule *Mytilus edulis*, l'activité catalase (CAT) est principalement peroxysomiale, l'activité superoxyde dismutase SOD est cytosolique (SOD à cuivre et zinc) et mitochondriale (SOD à manganèse) et les activités de glutathion peroxydase (GPXs sélénium-dépendante et sélénium-indépendante) sont principalement cytosoliques (Livingstone, 1992). Les activités CAT, SOD et GPX sélénium-dépendante sont plus importantes dans la glande digestive que dans les branchies ou les tissus musculaires (Gamble *et al.*, 1995).

De nombreuses études réalisées en laboratoire et sur le terrain, concernant les défenses anti-oxydantes et les enzymes détoxifiantes chez *Mytilus edulis*, montrent généralement des corrélations directes entre les défenses anti-oxydantes, les enzymes détoxifiantes, les dommages occasionnés sur les biomolécules et les xénobiotiques (Viarengo *et al.*, 1990; Lemaire & Livingstone, 1993; Rodriguez-Ariza *et al.*, 1993; Livingstone, 1998) mais aussi des corrélations avec les saisons (Sheehan & Power, 1999; Niyogi *et al.*, 2001; Vidal *et al.*, 2002).

L'augmentation de l'activité catalase a déjà été relevée chez des poissons et des bivalves exposés à des polluants organiques (HAP, PCB, pesticides et engrais chimiques) (Rodriguez-Ariza *et al.*, 1993; Torreilles *et al.*, 1996; Cossu *et al.*, 1997). Par ailleurs, les travaux effectués sur les biomarqueurs de stress oxydant en laboratoire et surtout *in situ* montrent que le caractère non spécifique de leur réponse constitue un avantage comme indicateur d'un état de pollution mixte (Cossu *et al.*, 1997).

6 - Le Malonedialdéhyde (MDA)

Le MDA est une expression de la lipoperoxydation (Pompella *et al.*, 1987; Sunderman, 1987). L'utilisation de ce composé comme biomarqueur de stress oxydatif en général, et en peroxydation lipidique en particulier, est largement répandu. Le MDA est un produit des réactions de peroxydation lipidique qui se forme lors de l'attaque des lipides polyinsaturés (de la famille n-6) par des espèces réactives de l'oxygène générées dans certaines conditions de stress, en particulier avec des contaminants organiques (HAP, PCB, pesticides) et inorganiques (métaux de transition). Les hydroperoxydes ainsi formés se décomposent en intermédiaires

radicalaires et en aldéhydes dont un des représentants les plus réactifs est le malonedialdéhyde (MDA). Le MDA est un agent alkylant puissant capable de réagir avec les macromolécules biologiques. Le dosage de ce composé présente donc un intérêt certain chez les animaux soumis à des contaminations multiples (Narbonne *et al.*, 1991, Pellerin-Massicote, 1994). Confirmé par l'étude Viarengo *et al.* (1990) de fortes teneurs en MDA chez des moules *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis* après une semaine d'exposition au cuivre.

7 - Détection de métabolites d'HAP dans la bile

L'excrétion biliaire constitue chez les vertébrés une voie privilégiée d'élimination de certains métabolites de xénobiotiques hydrophobes notamment les HAP, qui se retrouvent ainsi concentrés dans la bile. Or il s'est avéré que beaucoup de ces métabolites ont la propriété d'être fluorescents ce qui en facilite grandement la détection. Pour connaître l'exposition d'organismes à des mélanges d'hydrocarbures, il suffit donc de mesurer la fluorescence de leurs métabolites dans la bile. Cette mesure est possible seulement chez les poissons. Il existe plusieurs techniques plus ou moins complexes selon que l'on désire avoir une idée globale de l'exposition ou bien identifier plus précisément les hydrocarbures par leurs produits d'excrétion.

En ce qui concerne le milieu dulçaquicole, les dosages des métabolites dans la bile ont été utilisés avec succès chez plusieurs espèces de poissons telles que la perche (*Perca fluviatilis*) (Landner *et al.*, 1994), le chabot (*Cottus gobio*) (Karel *et al.*, 1999) et l'anguille (*Anguilla anguilla*) (Van der Oost *et al.*, 1996) aussi bien *in situ* qu' *in vivo* comme l'exposition de truites exposés à un mélange d' HAP pendant 41 jours (Barra *et al.*, 2000). Les variations observées sur le terrain vont toujours dans le sens d'une augmentation sur les sites contaminés, les niveaux de référence étant très faibles ou nuls. L'amplitude de réponse est par conséquent très importante et permet la discrimination des différents niveaux de contamination. Ce marqueur, s'il est limité aux seuls HAP, permet de mettre en évidence une contamination du milieu avec plus de facilité et de sûreté que des analyses chimiques dans les tissus où les teneurs en HAP peuvent être faussées par les mécanismes de métabolisation. Collier *et al.*, en 1991 ont montré qu'une correction des valeurs mesurées par un dosage des concentrations en pigments biliaires peut être nécessaire pour éliminer l'influence du comportement alimentaire du poisson sur les concentrations en métabolites recherchés.

En résumé, le dosage des métabolites biliaires fluorescents (FAC) chez les poissons est un marqueur de la contamination des milieux aquatiques par les

composés aromatiques (HAP) et certains effluents papetiers. Son amplitude de réponse est très importante et son emploi plus ou moins aisé suivant les protocoles, mais sa nature limite son usage aux poissons et autres vertébrés aquatiques.

CHAPITRE II : MILIEU MARIN (MER MEDITERRANÉE)

Jusqu'à une époque récente, la mer dans l'esprit des hommes était source de mystères et de richesse fabuleuse. De nos jours les mystères disparaissent un à un et avec eux de nombreux mythes qui s'estompent pour laisser la place à une réalité plus scientifique : les ressources biologiques des océans sont importantes mais malheureusement soumises à différents polluants et à l'action humaine, elles sont facilement épuisables.

Le laboratoire LPTC était impliqué dans le programme européen BIOMAR (1995-1998) dont le but était d'étudier l'impact de la contamination des eaux et des sédiments de la Mer Baltique et de la Mer Méditerranéenne sur des moules. Le projet européen BEEP est une suite élargie du projet BIOMAR soutenu par la Communauté Européenne.

Ce chapitre présente les principaux résultats des dosages biochimiques effectués chez *Mytilus galloprovincialis* au cours de 5 campagnes océanographiques. Les biomarqueurs mesurés dans les tissus des bivalves seront analysés. Les données recueillies dans cette étude, étant très importantes, nous ne présenterons que les mesures qui serviront à établir l'indice de pollution afin de classer les sites selon leur degré de contamination. Une carte sera établie qui permettra de visualiser l'évolution de chaque site sur une période de trois ans.

I Matériels et méthodes

1- Les sites d'études

Le LPTC s'est intéressé dans le programme BEEP à la région nord de la côte méditerranéenne (espagnole, française et italienne). De 2000 à 2003, cinq missions de prélèvement ont été effectuées dans cette zone à bord du navire océanographique (Europe) de l'IFREMER. Le choix des sites et des contaminants étudiés a largement tenu compte des données du Réseau National d'Observation (RNO). Au total 19 sites ont été sélectionnés répartis sur trois pays.

Les sites comprennent des stations très peu polluées (côte française Fos sur Mer), des stations moyennement contaminées tels que des sites à activités balnéaires (Portofino, Italie) et des sites à activités industrielles et portuaires importantes (port de Barcelone, Espagne) (Figure 8).

a) Site 1 : Golfe de Fos sur Mer-Marseille (France)

Le Golfe de Fos/Mer-Marseille est un endroit caractérisé par un trafic maritime intense, les rejets urbains d'une très grande ville et l'activité pétrochimique la plus importante de France. D'un point de vue géographique, ce site est entouré par le delta du Rhône dans l'Ouest et la ville de Marseille à l'Est. Ce secteur est sous l'influence des polluants du delta du Rhône : industries pétrochimiques de Fos/Mer (raffineries de pétrole) et collecteurs d'eau usagée de Marseille (population

3.000.000 d'habitants). Le dragage important du port de Marseille fait de ce secteur une zone sensible.

b) Site 2 : Côte Occidentale de ligure (Italie)

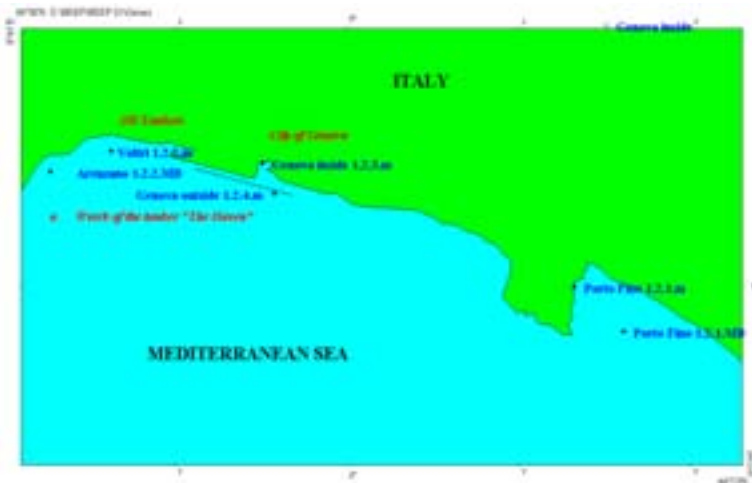
La partie occidentale de la côte ligure (province de Gênes) est un secteur fortement influencé par la pollution. Ce secteur contient une raffinerie pétrochimique et reçoit un certain nombre d'effluents industriels. Les particules atmosphériques, les huiles déversées ainsi que la décharge des métaux lourds, principalement du chrome représentent des sources importantes de polluants pour ce secteur. Au printemps de l'année 1991, s'est échoué le pétrolier Haven, le long de la côte de ligure. Le déversement d'une grande quantité de pétrole brut a provoqué plusieurs problèmes écologiques sérieux (pollutions marine et atmosphérique, dommages à la faune et la flore marines, risque d'exposition humaine, etc.).

c) Site 3 : Côte Le delta de l'Ebre (Espagne)

Le delta de l'Ebre est une plaine alluviale d'environ 350 km² situées dans le bassin méditerranéen occidental (Nord de l'Espagne). Environ 20% de sa surface est couvert par des lagunes et des marais. Le reste est consacré à des activités agricoles intensives, principalement la culture du riz. Le cycle hydrologique a une grande importance écologique puisqu'il règle la productivité de ce secteur. C'est aussi un facteur principal dans la période de reproduction de beaucoup d'espèces migratrices. Il agit également dans le transport des biocides des champs de récolte de riz aux compartiments, où des fermes marines sont localisées. La coexistence de l'agriculture, de l'aquaculture (4.000-5.000 tonnes métriques) et des activités intensives de pêche (9.000 tonnes métriques) dans ce secteur exige le développement d'outils de surveillance pour évaluer l'exposition des organismes marins face à ces biocides.



SITE 2 : GOLFE DE GENE



SITE 3 : Côte Le delta de l'Ebre



Figure 8 : localisation des sites d'échantillonnage

2- Choix de l'espèce sentinelle : la moule *Mytilus galloprovincialis*

a)- Généralités

-Systématique

Embranchement : Mollusca
Classe : Bivalva (Linné, 1758)
Sous-classe : Pteromorpha (Beurlen, 1944)
Ordre : Filibranchia (B.B. Woodward, 1892)
Sous-ordre : Anisomyaria
Super-Famille : Mytiloidea (Rafinesque, 1815)
Famille : Mytilidae (Rafinesque, 1815)
Genre : *Mytilus* (Linné, 1758)
Espèce : *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)
Nom commun : Moule méditerranéenne



- **Lieu de vie** Les moules sont des animaux avec une très large répartition autour des continents. Elles constituent généralement une composante importante des écosystèmes marins littoraux. Leur biotope s'étend de la limite haute de l'étage médiolittoral supérieur jusqu'à des profondeurs de 6 à 9 m avec possibilité d'atteindre 30 à 40 m dans certaines régions comme la mer baltique.

La moule méditerranéenne, comme son nom l'indique, est principalement répartie dans cette région le long des côtes européennes et maghrébines. Elle y est présente à l'exception du sud oriental sur les côtes Adriatiques et de la Mer noire (Lubet, 1991). Elle se rencontre aussi sur les côtes atlantiques *i)* du sud de l'Irlande et la Cornouaille, *ii)* de l'Europe et de l'Afrique du Nord (Maroc) Cette espèce cohabite avec *Mytilus edulis* en atlantique Nord jusqu'à la Manche (Lubet, 1973 ; Dradignac-Corbeil, 1976) et avec *Perna perna* en atlantique sud jusqu'aux côtes sud marocaines (Bitar, 1987).

- **Nourriture** la nourriture des moules est très diverse elle est à base de diatomées, dinoflagellés, bactéries, flagellés, protozoaires, divers spores, fragments d'algues et de débris inorganiques (Lubet, 1978). La nutrition a un effet important dans la répartition des moules qui prolifèrent généralement dans les zones riches en phytoplancton, en matières organiques dissoutes ou en suspension et en bactéries (Lubet, 1973). L'eau contenant ces éléments est filtrée à travers les branchies (deux paires de feuillets hémibranchies) qui grâce aux battements de leurs cils, acheminent ainsi les particules englobées de mucus vers les palpes labiaux qui les prennent en charge vers la bouche et le tube digestif.

Le taux et la vitesse de filtration varient en fonction de l'âge, de facteurs internes (système neuroendocrine) et externes (conditions du milieu) (Lubet & Chappuis, 1966). Le volume d'eau filtré est de l'ordre de 40 et 100 ml par minute et par gramme de poids sec pour un individu d'une taille de 50 à 60 mm. L'eau qui traverse la cavité palléale semble être totalement épurée des particules qu'elle contient, dans la mesure où la charge particulaire n'est pas trop forte (Tammes & Dral, 1956). La fonction de filtration en terme d'intensité de l'activité de fréquence et de durée d'ouverture et de fermeture de la coquille a été utilisée comme indicateur comportemental de pollution (Walne, 1972 ; Abel, 1967 ; Kramer, 1989).

En effet, ce mode d'alimentation expose d'autant plus ces animaux aux polluants qu'ils vont les bioaccumuler.

La croissance des moules dépend de plusieurs paramètres biotiques et/ou abiotiques. L'étude biométriques de Lubet (1973) a montré que la croissance de *M. galoprovincialis* varie selon les biotopes et les conditions physico-chimiques du milieu, ainsi que selon la densité de la population qui augmente beaucoup dans les zones soumises aux influences océaniques.

La fécondation chez les moules est externe et a lieu en pleine eau. Les développements embryonnaires et larvaires se déroulent dans les dix premiers mètres de la zone littorale. Lors de la métamorphose, les larves se transforment en jeunes benthiques. Leur fixation a lieu souvent sur des algues filamenteuses.

b)- Rappel sur l'organisation de l'appareil génital

Chez les moules, la gonade est diffuse dans le manteau et la masse viscérale. Elle est formée par des acini qui aboutissent à des gonoductes constitués par un épithélium cilié uni-stratifié.

L'évacuation des produits génitaux par les gonoductes s'effectue par des mouvements ciliaires sans péristaltisme (Iwata, 1949), car il n'existe aucune formation musculaire autour des gonoductes (Lubet, 1959).

Les gonoductes issus des différents follicules forment dans le manteau trois troncs principaux (Figure 9) qui confluent dans la région dorsale du corps, au niveau de la partie inférieure du péricarde. Ce tronc commun reçoit alors un canal qui draine le côté correspondant de la masse viscérale. Le gonoducte terminal suit la paroi

latérale du corps et aboutit au processus génital qui débouche un peu au-dessus et en avant par rapport à l'orifice rénal ; les voies génitales et urinaires sont distinctes. Le processus génital peut se gonfler au moment de l'émission pour constituer une ampoule. Il possède une musculature propre permettant de constater l'existence de mouvements péristaltiques lors de l'évacuation des produits génitaux. Les descriptions classiques montrent que y'a pas de différences morphologiques entre ces organes chez *M. edulis* et *M. galloprovincialis* (Lubet, 1959)

Ebauche génitale

Chez *M. edulis* de 5 à 7 mm (2 mois), l'ébauche génitale est constituée par un massif cellulaire situé dans la région moyenne du corps, dans un plan passant par le niveau de la communication oreillettes-ventricule et perpendiculaire à l'axe du corps.

Elle est localisée dans le tissu conjonctif qui relie la masse viscérale à la saillie ventrale du corps appelée « bosse de Polichinelle » (ou « glande de Polichinelle »). Cette ébauche va donner naissance à deux cordons cellulaires, symétriques par rapport au plan sagittal et qui s'accroissent en direction de la région dorsale de l'animal. Chacun d'entre eux se ramifie en deux branches, la plus interne qui se dirige vers la région médiane et la plus externe qui croît vers la périphérie en longeant la face interne des muscles rétracteurs du byssus. Les premiers follicules dérivent des deux ébauches précédentes par multiplication des gonies.

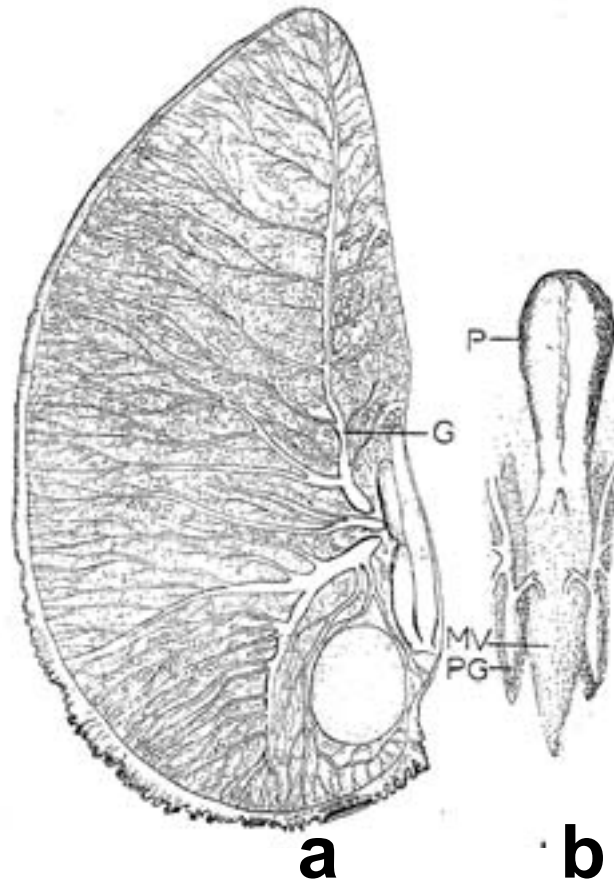


Figure 9: Schéma des voies génitales a) femelle avant la ponte, vue latérale. b) le processus génital vue ventrale. G : gonoductes. MV :masse viscérale. P : pied.
PG : processus génital

c)-Intérêt de la moule comme espèce sentinelle

Le choix d'une espèce sentinelle pour analyser différents biomarqueurs repose sur les critères classiques suivant:

- Large répartition géographique sur la zone étudiée,
- Sédentarité,
- Représentativité dans l'écosystème étudié,
- Facilité de capture.

L'espèce retenue est la moule *Mytilus galloprovincialis* car elle répond aux critères évoqués précédemment avec de plus, une grande capacité d'accumulation des contaminants. Elles sont sédentaires, assez faciles à collecter et à manipuler, aisément utilisables dans le cadre des expérimentations de transplantation. Ces caractéristiques en font un organisme très utilisé dans les programmes de surveillance de la pollution des écosystèmes côtiers du type (*Mussel Watch*),

Farrington. ; 1991) comme le RNO en France (Bayne, 1989 ; Claisse, 1990) ou BIOMAR, pour la Mer Baltique. De plus, la moule a été fréquemment utilisée comme modèle dans des études expérimentales d'exposition aux contaminants environnementaux en laboratoire. Les mécanismes de toxicité de ces contaminants ainsi que les systèmes de biotransformation utilisés comme biomarqueurs commencent à être bien connus (Narbonne & Michel, 1997).

3- Echantillonnage

Les moules ont été récoltées en plongée ou par dragage (selon les sites). Les animaux récoltés ont été disséqués de façon à éliminer le byssus et le pied. Les branchies et la glande digestive ont été prélevées après élimination du stylet cristallin, puis plongées le plus rapidement possible dans de l'azote liquide et conservées ainsi jusqu'au traitement des échantillons au laboratoire. Par site, les échantillons sont composés de 5 pools de 10 branchies et 5 pools de 10 glandes digestives.

4-Dosage biochimiques

Les fractions subcellulaires (fraction post-mitochondriale et microsomes) des différents tissus et organes prélevés, nécessaires au dosage des biomarqueurs, sont préparées extemporanément.

Cinq marqueurs biochimiques ont été dosés au niveau des branchies ou de la glande digestive : le taux de MDA, et les activités BPH, CAT, GST et l'AChE (Figure 10): L'activité BPH et l'AChE ont été réalisées au Laboratoire de l' IFREMER de Nantes.

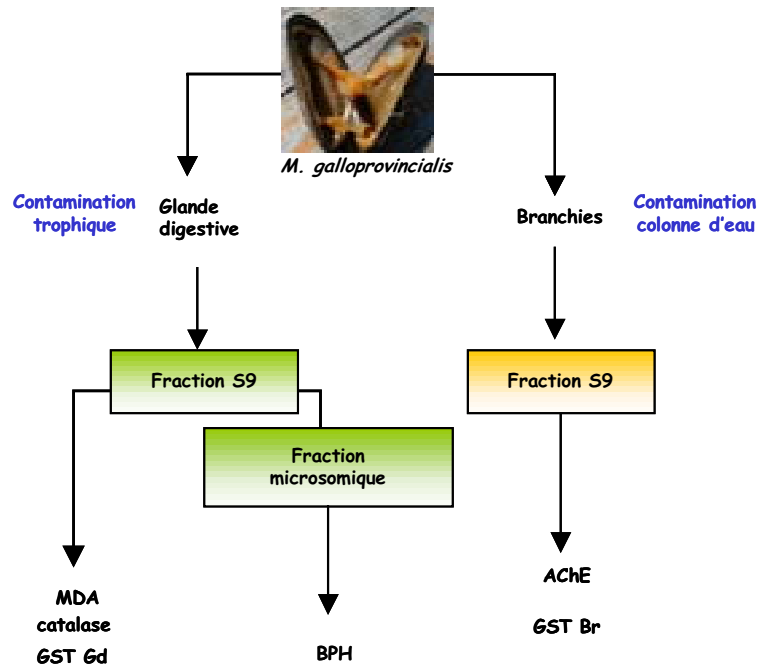
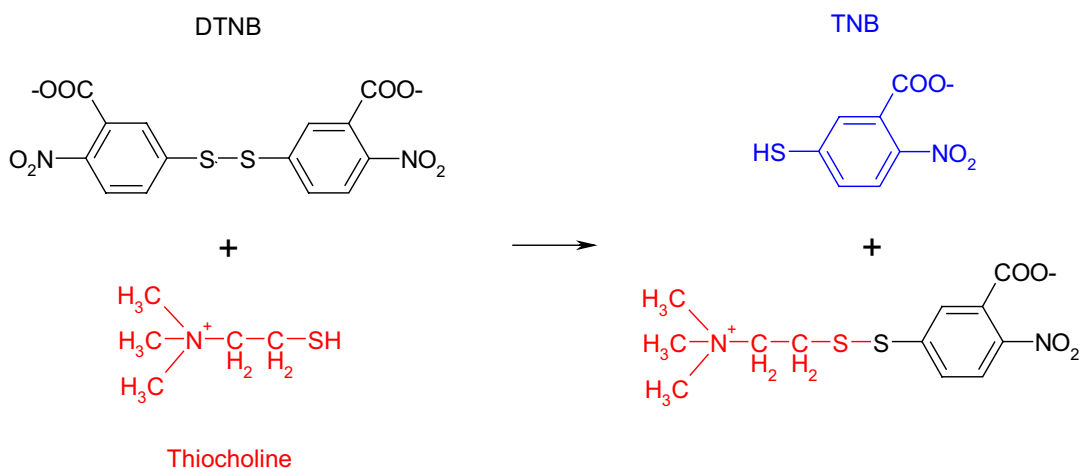


Figure 10 : Utilisation des tissus de moule (*Mytilus galloprovincialis*) pour les mesures des marqueurs biochimiques.

L'activité AChE a été mesurée sur la fraction post-mitochondriale (S9) de branchies selon la méthode adoptée d'Ellman *et al.* (1961) en utilisant l'acétylthiocholine comme substrat à une concentration de 2 mM dans la cuve. La variation de densité optique provoquée par la libération d'un produit coloré, le TNB, au cours de la réaction enzymatique est lue pendant 30 secondes à 412 nm à 25°C.



L'activité BPH a été dosée d'après la technique de Denhen *et al.* (1973) et adaptée aux tissus de moule par Michel *et al.* (1993). C'est une technique qui utilise le dosage en fluorimétrie de l'apparition d'un métabolite du B(a)P : le 3OH B(a)P en présence

de NADPH. La réalisation d'une gamme étalon de 3OH-B(a)P permet le calcul de la quantité de produit formé durant la réaction enzymatique.

- **L'activité CAT** a été mesurée sur la fraction post-mitochondriale (S9) de glandes digestives par la méthode de Greenwald (1985) utilisant l'eau oxygénée comme substrat. La disparition de l'eau oxygénée, est suivie à 240 nm pendant 30 secondes à 25°C.

- **L'activité GST** a été mesurée sur la fraction post-mitochondriale de branchie et de glande digestive (S9) d'après la technique de Habig *et al.* (1974) en utilisant le dichloronitrobenzène (DCNB) comme substrat. La variation de densité optique est lue à 340 nm pendant 30 secondes, la réaction à lieu à 25°C.

- **Le taux de MDA** a été mesuré dans la fraction post-mitochondriale des glandes digestives après complexation avec l'acide thiobarbiturique (TBARS) produisant un chromophore détecté sur un lecteur UV de microplaque à 532 nm, selon la méthode adaptée de Buege *et al.* (1978). Cette technique, relativement simple, suscite cependant quelques interrogations, en particulier, sur son manque de spécificité car le TBARS réagit également avec d'autres composés présents tels que les alcadiénals (Kikagawa *et al.*, 1990). Les concentrations sont exprimées en nmol.ml^{-1} de S9.

Ces trois méthodes de dosage sont des techniques de **cinétique enzymatique** utilisant la variation de densité optique du milieu réactionnel pour le calcul des activités. Le spectrophotomètre utilisé est de type différentiel, thermostaté à 25 °C.

Le dosage des **protéines** a été effectué selon la méthode de Bradford *et al.* (1976) adaptée en microplaque utilisant le réactif Bio-Rad (Laboratoires Bio-Rad GmbH). Ce dernier se lie aux protéines en déplaçant son pic d'absorption maximum à 595 nm. La quantité de protéines est déterminée par comparaison à une gamme d'albumine sérique de bovin (BSA, Sigma-Aldrich).

Résultats

Les résultats sont discutés dans l'article 1

Scale of classification based on biochemical markers in mussel: application to pollution monitoring in Mediterranean coasts and temporal trends.

Narbonne J.F., Aarab N., Clérandeau C., Daubèze M., Narbonne J., Champeau O. and Garrigues P.

Soumises à *Biomarkers*

Scale of classification based on biochemical markers in mussel: application to pollution monitoring in Mediterranean coasts and temporal trends.

Narbonne J.F., Aarab N., Clérandeau C., Daubèze M., Narbonne J., Champeau O. and Garrigues P.

Laboratoire de Physico et Toxicochimie des Systèmes Naturels, UPRESA CNRS 5472, Université Bordeaux 1, F-33405 Talence, France.

Corresponding author: J.F. Narbonne, Toxicologie Biochimique, LPTC CNRS 5472, Avenue des Facultés 33405 Talence Cedex, France. E-mail: jf.narbonne@lptc.u-bordeaux1.fr.

Abstract

A battery of biochemical parameters is used to evaluate the response of mussels to contaminated coastal environment. Following multimarker approach was developed, establishing a scale for the classification of the water quality in European coastal sites (BIOMAR European program). This present study allow to evaluate the temporal trends of this scale apply to selected sites of European Mediterranean cost (BEEP European program). Acetylcholinesterase activity is highly sensitive to organophosphorus and carbamate insecticides but also to heavy metals. Catalase activity and lipid oxidation (evaluated as malonedialdehyde) are markers of oxidative stress, Glutathion S-transferase activity is related to conjugation of organic compounds and benzo(a)pyrene hydroxylase activity is marker of planar compounds (e.g. 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 discriminant biomarkers. As result of our calculation method, the quality of coastal environment at each site can be classified in a five levels scale. Samples collected for 5 cruises in May 2001, 2002, 2003 and September 2001 and 2002 shown MPI evolutions. The results show that water quality can be classified from class 1 (clean areas in some sites of French , Italian and Spanish) to class 4 (high pollution in main harbours). Results of the use of biomarker scale in WP3 during the BEEP program provide strong contribution to establish standardized strategies and methods for internationally agreed protocols for biomarker based monitoring programs.

In comparison with scale pollution methodology used in BIOMAR program, the main contribution of BEEP was:

- to select from discriminant analysis, the biomarkers to be included in calculation of scale pollution,
- to improve the use of biomarker index in order to identify the main contaminants by analysis of individual contribution to the MPI,
- 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.

Introduction

Over the past decade, early molecular and cellular biomarkers have been extensively used in pollution monitoring in aquatic environments (Mc Carthy and Shuggart, 1990 ; Huggett *et al.*, 1992). Biomarkers were selected among early molecular events occurring in the toxicological mechanisms of main contaminants (PAHs, PCBs, heavy metals, pesticides...) 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 (Regoli and Principato, 1995; Pellerin-Massicotte, 1994; Prakash and Rao 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, Mc Carthy *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 taken in account chemical or biological criteria, in order to classify the sites being monitored in a scale from “clean” to “highly polluted” (usually 4 for microbiological criteria, or 5 levels for chemical criteria, C.B.A.G., 1996). 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 program (1994-1998) the pollution index scale was developed and firstly applied to european coast. WP3 was part of BEEP program (supported by the E.U. commission) and aimed to validate the multimarker approach in pollution monitoring of European coastal environments. The aims of this study is to evaluate the temporal trends of this scale apply to selected sites of european Mediterranean coast. Working sites (identified as clean, intermediate and polluted) were selected in Italian, French and

Spanish coast, based on historical knowledge (chemical and biological data) by participant scientific groups.

Materials and methods

a)- Sample collection and preparation

Mussels -*Mytilus galloprovincialis*- were collected from stations in the European coast either by grab or by skin divers (in water depth up to 40 m). Coastal sites from Mediterranean sea (France, Italy and Spain) were expected to present a wide variety of contamination patterns, from preserved areas (Aragón, Porto Fino, Cala Monjoy), intermediate areas (Lavera, Cortiou, Voltri, Fangal, Los Alfaques) to highly polluted harbours in continental coast (Fos harbour, Genova harbour, Barcelona). Five sampling cruises took place in the same area (May 2001, September 2001, May 2002, September 2002 and May 2003). Gills and digestive glands were dissected and immediately stored in liquid nitrogen prior to analysis.

b)- Biochemical measurements

Biochemical determinations were carried out as previously 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 in after reaction with thiobarbituric acid (Buege and Aust, 1978). All these data were expressed in relation to protein concentration determined according to the method of Lowry *et al.*, (1951).

c)- Statistical procedure and indices calculation

An ANOVA analysis was used to determine statistical significance of the individual biochemical variables among sites. Tukey's test was used to determine 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. Ed., 2002). 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 develop a simple scoring approach to provide a relative comparison among sites that exhibited multiple biomarker responses. Multimarker pollution index (MPI) for each site is calculated as

$$MPI_i = \sum_{j=i} BPI$$

Where i = site, j = biomarker, BPI=Biomarker pollution index from the table of conversion (Table 1) for individual mean (X_i), related to discriminatory factor (DF) of the measure.

$$DF = (X_{max} - X_{min} + CI) / CI$$

Where X_{max} = Mean max, X_{min} = Mean min, CI = 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 in 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 firstly applied in European BIOMAR Program.

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

Results

a)- Discriminant analysis

As result of discriminant analysis the individual biomarker variables are shown in table 2. In order to select the biomarkers that have the most influence in distinguishing among site responses, a discriminatory power was calculated by ranking analysis as shown in table 3.

Discriminatory power is calculated as

$$DP_i = \sum_{r=1}^n RV_i/1 + \sum_{r=2}^n RV_i/2 + \sum_{r=3}^n RV_i/3$$

Where, i = biomarker, n = number of cruises, r = root of discrimination, RV_i = 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 and MDA dg. Therefore, the first five biomarkers were selected for MPI calculation.

Table 2: Individual biomarker variables (canonical roots) resulted to discriminant analysis.

	Variable	Root 1	Root 2	Root 3
May 2001 BEEP 1	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
Sept. 2001 BEEP 2	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 3	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
Sept. 2002 BEEP 4	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 5	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

Table 3: Calculation of discriminatory power for each biomarker by ranking analysis of variables shown in table 1.

	Root 1						Root 2						Root 3						Dicriminatory 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

b)- Index calculation

The results of biomarkers measurement to built scale are presented in table 4, the discriminatory factors are presented in table 5, the MPI and BPI are presented in table 6 and contribution of each biomarker by station are presented in figure 1.

The Multimarker Pollution Index of each station, each site for each cruise is converted in five pollution levels (from highly to lightly contaminated) and associate to a colour from blue to red (or number from 1 to 5) related to pollution level.

These colours are reported in figure 2, respectively 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, selected by local research groups in Italy, France and Spain. The relationship between biomarker response and environmental characteristics were investigated using MPI value and the profiles of biomarker contributions to 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 (fig 2 A) that the higher MPI was measured in Cortiou (supposed hot spot) but there was no significant differences between sites in gulf of Fos (supposed gradient). Results of temporal trends showed that MPI remained high in Cortiou (except in may 2002), the mean MPI from 4 cruises was 38. MPI average from 5 cruises appeared relatively low in Fos and Lavera (24) with slight seasonal variation (green or blue). Aragnon exhibited intermediates MPI (mean=28). Biomarker contribution profiles suggested pollution by organic compounds in Aragnon, pollution by PAHs in Fos (especially in May 2001) and mixed pollution (heavy metals and organic compounds) in Cortiou.

Italian sites (fig 2 B) may be ranged by using MPI average from 5 cruises as follow: Porto Fino (31), Genova in (30), Voltri (29) and Genova out (28). However wide seasonal variations were shown in Genova harbour (from orange to green) and Voltri (from orange to blue). This last site appeared to be strongly impacted in May 2003. Biomarker contribution profiles suggested PAHs and heavy metals pollutions in Genova harbour and Voltri, especially in May 2001 and 2003. Porto Fino appeared impacted by organic pollution.

Spanish sites (fig 2 C) may be ranged from higher to lower MPI averages from 4 cruises: Barcelona (34), Cala Monjoy (32), Los Alfaques and Fangal (22). 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 wastes collected by Llobregat river).

Genova 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 decrease of enzyme activities due to toxic effects in biota due to high pollution levels.

Table 4: Results of biomarker measurements for each station by site studied during BEEP cruises in Mediterranean Sea in 2001-2003

nd: not determined, g: gills, dg: digestive gland, MCI: Mean Confidence Interval, SE:

Site	Station	Campain	AChE activity in g	GST activity in g	GST activity in dg	CAT activity in dg	BPH activity in dg	MDA level in dg
			nmol/mn/mg protein	nmol/mn/mg protein	nmol/mn/mg protein	μmol/mn/mg protein	pmol/mn/mg protein	nmol/ mg protein
			Mean ± MCI	Mean ± MCI	Mean ± MCI	Mean ± MCI	Mean ± MCI	Mean ± SE
FRANCE	111 Aragnon	May 2001	52,45 ± 13,0	405,13 ± 140,5	267,48 ± 30,4	67,20 ± 16,8	96,85 ± 18,3	0,904 ± 0,213
	211 Aragnon	September 2001	39,11 ± 5,3	320,01 ± 51,4	141,11 ± 26,6	80,42 ± 21,9	28,51 ± 14,9	0,737 ± 0,390
	311 Aragnon	May 2002	50,30 ± 7,8	364,76 ± 64,3	157,67 ± 26,4	134,07 ± 15,5	14,67 ± 8,0	0,127 ± 0,040
	411 Aragnon	September 2002	88,53 ± 14,4	450,24 ± 68,0	92,35 ± 11,3	59,70 ± 9,9	38,49 ± 18,6	0,288 ± 0,045
	511 Aragnon	May 2003	20,00 ± 2,0	391,25 ± 91,1	305,98 ± 47,8	125,37 ± 23,2	nd	2,143 ± 0,774
	112 Lavera	May 2001	42,51 ± 13,0	309,83 ± 140,5	209,37 ± 30,4	50,86 ± 16,8	70,02 ± 18,3	0,993 ± 0,312
	212 Lavera	September 2001	31,38 ± 5,3	356,36 ± 51,4	114,69 ± 26,6	93,69 ± 21,9	23,62 ± 14,9	0,362 ± 0,239
	312 Lavera	May 2002	40,44 ± 7,8	221,09 ± 64,3	104,84 ± 26,4	92,99 ± 15,5	14,09 ± 8,0	0,211 ± 0,030
	412 Lavera	September 2002	51,61 ± 14,4	420,22 ± 68,0	69,93 ± 11,3	44,49 ± 9,9	11,72 ± 18,6	0,344 ± 0,084
	512 Lavera	May 2003	14,31 ± 2,0	463,63 ± 91,1	256,28 ± 47,8	119,43 ± 23,2	7,88 ± 6,1	1,300 ± 0,504
	113 Fos harbour	May 2001	41,64 ± 13,0	258,49 ± 140,5	210,02 ± 30,4	68,53 ± 16,8	35,10 ± 18,3	0,801 ± 0,226
	213 Fos harbour	September 2001	41,86 ± 5,3	406,73 ± 51,4	113,25 ± 26,6	54,35 ± 21,9	30,47 ± 14,9	0,557 ± 0,299
	313 Fos harbour	May 2002	39,84 ± 7,8	330,74 ± 64,3	127,87 ± 26,4	76,65 ± 15,5	7,69 ± 8,0	0,203 ± 0,073
	413 Fos harbour	September 2002	57,71 ± 14,4	455,77 ± 68,0	69,26 ± 11,3	51,99 ± 9,9	35,50 ± 18,6	0,275 ± 0,121
	513 Fos harbour	May 2003	10,69 ± 2,0	320,42 ± 91,1	262,63 ± 47,8	115,01 ± 23,2	12,47 ± 6,1	0,950 ± 0,536
	114 Cortiou	May 2001	32,47 ± 13,0	433,81 ± 140,5	262,64 ± 30,4	87,00 ± 16,8	7,45 ± 18,3	0,917 ± 0,276
	214 Cortiou	September 2001	30,27 ± 5,3	361,83 ± 51,4	173,60 ± 26,6	140,62 ± 21,9	63,26 ± 14,9	0,495 ± 0,147
	314 Cortiou	May 2002	42,54 ± 7,8	397,91 ± 64,3	165,07 ± 26,4	100,86 ± 15,5	15,14 ± 8,0	0,156 ± 0,041
	414 Cortiou	September 2002	22,94 ± 14,4	645,59 ± 68,0	107,39 ± 11,3	70,20 ± 9,9	11,31 ± 18,6	0,284 ± 0,125
	514 Cortiou	May 2003	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Standard Error

Article 1 : Scale of classification on biochemical markers in mussel

Site	Station	Campaign	AChE activity in g	GST activity in g	GST activity in dg	CAT activity in dg	BPH activity in dg	MDA level in dg
			nmol/mn/mg protein Mean ± MCI	nmol/mn/mg protein Mean ± MCI	nmol/mn/mg protein Mean ± MCI	μmol/mn/mg protein Mean ± MCI	pmol/mn/mg protein Mean ± MCI	nmol/ mg protein Mean ± CI
ITALY	121 Porto Fino	May 2001	58,87 ± 13,0	733,02 ± 140,5	194,74 ± 30,4	75,30 ± 16,8	65,94 ± 18,3	0,946 ± 0,284
	221 Porto Fino	September 2001	33,61 ± 5,3	260,22 ± 51,4	132,64 ± 26,6	97,13 ± 21,9	15,38 ± 14,9	0,764 ± 0,359
	321 Porto Fino	May 2002	45,18 ± 7,8	634,09 ± 64,3	162,62 ± 26,4	75,16 ± 15,5	15,60 ± 8,0	0,192 ± 0,085
	421 Porto Fino	September 2002	57,38 ± 14,4	531,98 ± 68,0	92,06 ± 11,3	75,38 ± 9,9	27,31 ± 18,6	0,390 ± 0,194
	521 Porto Fino	May 2003	20,73 ± 2,0	805,11 ± 91,1	319,27 ± 47,8	119,38 ± 23,2	16,35 ± 6,1	0,715 ± 0,237
	122 Voltri	May 2001	52,08 ± 13,0	584,81 ± 140,5	192,77 ± 30,4	80,35 ± 16,8	68,51 ± 18,3	1,057 ± 0,246
	222 Voltri	September 2001	28,50 ± 5,3	211,05 ± 51,4	95,07 ± 26,6	59,90 ± 21,9	13,83 ± 14,9	0,629 ± 0,297
	322 Voltri	May 2002	46,73 ± 7,8	372,42 ± 64,3	122,96 ± 26,4	64,48 ± 15,5	12,03 ± 8,0	0,218 ± 0,109
	422 Voltri	September 2002	47,40 ± 14,4	452,30 ± 68,0	64,10 ± 11,3	46,33 ± 9,9	32,47 ± 18,6	0,287 ± 0,092
	522 Voltri	May 2003	19,68 ± 2,0	751,66 ± 91,1	369,11 ± 47,8	142,71 ± 23,2	34,96 ± 6,1	0,415 ± 0,217
	123 Genova in	May 2001	45,71 ± 13,0	472,94 ± 140,5	181,74 ± 30,4	74,58 ± 16,8	28,46 ± 18,3	1,016 ± 0,471
	223 Genova in	September 2001	24,68 ± 5,3	300,72 ± 51,4	125,93 ± 26,6	42,04 ± 21,9	26,83 ± 14,9	0,248 ± 0,092
	323 Genova in	May 2002	33,79 ± 7,8	515,83 ± 64,3	170,63 ± 26,4	66,13 ± 15,5	25,27 ± 8,0	0,405 ± 0,061
	423 Genova in	September 2002	40,68 ± 14,4	415,52 ± 68,0	58,69 ± 11,3	32,94 ± 9,9	25,87 ± 18,6	0,252 ± 0,073
	523 Genova in	May 2003	15,46 ± 2,0	408,97 ± 91,1	227,26 ± 47,8	135,77 ± 23,2	34,96 ± 6,1	0,256 ± 0,099
	124 Genova out	May 2001	57,50 ± 13,0	648,75 ± 140,5	188,45 ± 30,4	72,21 ± 16,8	44,74 ± 18,3	1,029 ± 0,287
	224 Genova out	September 2001	30,44 ± 5,3	237,15 ± 51,4	91,93 ± 26,6	58,00 ± 21,9	88,83 ± 14,9	0,582 ± 0,218
	324 Genova out	May 2002	45,91 ± 7,8	426,07 ± 64,3	157,80 ± 26,4	68,68 ± 15,5	17,06 ± 8,0	0,279 ± 0,108
	424 Genova out	September 2002	43,85 ± 14,4	399,81 ± 68,0	51,61 ± 11,3	33,47 ± 9,9	75,45 ± 18,6	0,329 ± 0,136
	524 Genova out	May 2003	11,72 ± 2,0	424,53 ± 91,1	271,59 ± 47,8	129,97 ± 23,2	14,01 ± 6,1	0,543 ± 0,216

Site	Station	Campaign	AChE activity in g	GST activity in g	GST activity in dg	CAT activity in dg	BPH activity in dg	MDA level in dg
			nmol/mn/mg protein Mean ± MCI	nmol/mn/mg protein Mean ± MCI	nmol/mn/mg protein Mean ± MCI	μmol/mn/mg protein Mean ± MCI	pmol/mn/mg protein Mean ± MCI	nmol/ mg protein Mean ± CI
SPAIN	131 Cala Monjoy	May 2001	47,83 ± 13,0	589,60 ± 140,5	229,54 ± 30,4	85,77 ± 16,8	52,24 ± 18,3	0,679 ± 0,129
	231 Cala Monjoy	September 2001	27,79 ± 5,3	265,99 ± 51,4	171,16 ± 26,6	135,94 ± 21,9	18,49 ± 14,9	0,481 ± 0,224
	331 Cala Monjoy	May 2002	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	431 Cala Monjoy	September 2002	60,80 ± 14,4	486,38 ± 68,0	87,25 ± 11,3	84,95 ± 9,9	28,68 ± 18,6	0,271 ± 0,026
	531 Cala Monjoy	May 2003	12,24 ± 2,0	270,66 ± 91,1	271,09 ± 47,8	112,18 ± 23,2	27,33 ± 6,1	1,023 ± 0,473
	132 Fangal	May 2001	55,62 ± 13,0	382,51 ± 140,5	167,31 ± 30,4	44,53 ± 16,8	46,08 ± 18,3	0,677 ± 0,058
	232 Fangal	September 2001	14,89 ± 5,3	189,94 ± 51,4	123,24 ± 26,6	116,82 ± 21,9	36,62 ± 14,9	1,373 ± 0,855
	332 Fangal	May 2002	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	432 Fangal	September 2002	42,66 ± 14,4	241,55 ± 68,0	62,04 ± 11,3	28,63 ± 9,9	34,52 ± 18,6	0,242 ± 0,082
	532 Fangal	May 2003	14,50 ± 2,0	275,59 ± 91,1	216,19 ± 47,8	107,51 ± 23,2	10,12 ± 6,1	0,699 ± 0,347
	133 Los Alfaques	May 2001	55,79 ± 13,0	351,42 ± 140,5	128,94 ± 30,4	42,79 ± 16,8	38,73 ± 18,3	0,812 ± 0,378
	233 Los Alfaques	September 2001	27,26 ± 5,3	598,15 ± 51,4	120,11 ± 26,6	61,74 ± 21,9	9,96 ± 14,9	0,294 ± 0,229
	333 Los Alfaques	May 2002	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	433 Los Alfaques	September 2002	25,30 ± 14,4	360,81 ± 68,0	70,14 ± 11,3	34,19 ± 9,9	13,85 ± 18,6	0,123 ± 0,045
	533 Los Alfaques	May 2003	16,57 ± 2,0	481,56 ± 91,1	186,48 ± 47,8	110,82 ± 23,2	5,07 ± 6,1	0,471 ± 0,111
	134 Barcelone	May 2001	43,90 ± 13,0	1054,39 ± 140,5	236,40 ± 30,4	40,34 ± 16,8	46,35 ± 18,3	1,516 ± 0,685
	234 Barcelone	September 2001	8,15 ± 5,3	466,66 ± 51,4	119,36 ± 26,6	38,03 ± 21,9	18,48 ± 14,9	0,278 ± 0,075
	334 Barcelone	May 2002	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	434 Barcelone	September 2002	30,45 ± 14,4	458,27 ± 68,0	77,11 ± 11,3	31,32 ± 9,9	17,78 ± 18,6	0,266 ± 0,075
	534 Barcelone	May 2003	5,99 ± 2,0	427,61 ± 91,1	275,83 ± 47,8	175,99 ± 23,2	11,46 ± 6,1	0,821 ± 0,312

Table 5: Discriminatory levels obtained for each BEEP cruise in Mediterranean Sea in 2001-2003.

Cruise	Biomarkers	Response Factor RF	Response Range RR	Confidence Interval CI	Discriminatory Factor DF	Discriminatory Levels DL	
May 2001	AChE g	3,77	63,93	26,00	3,46	2	
BEEP 1	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	
	AChE g	12,33	44,29	10,60	5,18	4	
Sept. 2001	BEEP 2	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	
	AChE g	1,49	16,50	7,83	2,05	2	
May 2002	BEEP 3	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	
	AChE g	3,86	65,59	14,45	3,27	3	
Sept. 2002	BEEP 4	GST g	2,67	404,04	67,98	3,97	4
	GST dg	2,08	55,78	11,30	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	
	AChE g	3,46	14,74	1,98	4,72	4	
May 2003	BEEP 5	GST g	2,97	534,44	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	

Table 6: Index of biomarker responses and Multimarker Pollution Index (MPI) for each site studied during BEEP cruises 2001-2003.

Site	Station	Campain	Biomarkers pollution index					MPI
			AChE g	GST g	GST dg	CAT dg	BPH dg	
FRANCE	111 Aragnon	May 2001	4	4	12	6	12	38
	211 Aragnon	Sept. 2001	2	2	6	6	6	22
	311 Aragnon	May 2002	4	4	10	12	4	34
	411 Aragnon	Sept. 2002	3	7	7	7	6	30
	511 Aragnon	May 2003	2	4	6	4	nd	20
	112 Lavera	May 2001	10	2	6	6	6	30
	212 Lavera	Sept. 2001	2	4	3	3	6	18
	312 Lavera	May 2002	10	4	4	6	4	28
	412 Lavera	Sept. 2002	6	7	4	4	3	24
	512 Lavera	May 2003	4	4	6	4	3	21
	113 Fos harbour	May 2001	10	2	6	3	12	33
	213 Fos harbour	Sept. 2001	4	4	3	6	3	20
	313 Fos harbour	May 2002	10	2	4	3	4	23
	413 Fos harbour	Sept. 2002	6	4	4	4	6	24
	513 Fos harbour	May 2003	7	2	6	4	3	22
	114 Cortiou	May 2001	10	4	12	12	3	41
	214 Cortiou	Sept. 2001	4	4	12	12	6	38
	314 Cortiou	May 2002	4	4	10	6	4	28
414 Cortiou	Sept. 2002	12	12	12	7	3	46	
514 Cortiou	May 2003	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
ITALY	121 Porto Fino	May 2001	4	7	6	12	6	35
	221 Porto Fino	Sept. 2001	4	2	6	6	3	21
	321 Porto Fino	May 2002	4	12	10	3	10	39
	421 Porto Fino	Sept. 2002	6	7	7	7	6	33
	521 Porto Fino	May 2003	2	12	6	4	6	30
	122 Voltri	May 2001	4	4	6	12	12	38
	222 Voltri	Sept. 2001	4	1	3	3	3	14
	322 Voltri	May 2002	4	4	4	3	4	19
	422 Voltri	Sept. 2002	6	7	4	4	6	27
	522 Voltri	May 2003	2	12	12	10	12	48
	123 Genova in	May 2001	10	4	6	12	3	35
	223 Genova in	Sept. 2001	4	2	6	3	6	21
	323 Genova in	May 2002	10	7	10	3	10	40
	423 Genova in	Sept. 2002	6	4	2	2	6	20
	523 Genova in	May 2003	4	4	3	10	12	33
	124 Genova out	May 2001	4	7	6	6	6	29
	224 Genova out	Sept. 2001	4	1	3	3	12	23
	324 Genova out	May 2002	4	4	10	3	10	31
424 Genova out	Sept. 2002	6	4	2	2	12	26	
524 Genova out	May 2003	7	4	6	10	6	33	
SPAIN	131 Cala Monjoy	May 2001	4	4	6	12	6	32
	231 Cala Monjoy	Sept. 2001	4	2	12	12	3	33
	331 Cala Monjoy	May 2002	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	431 Cala Monjoy	Sept. 2002	6	7	7	12	6	38
	531 Cala Monjoy	May 2003	7	2	6	4	6	25
	132 Fangal	May 2001	4	2	6	3	6	21
	232 Fangal	Sept. 2001	7	1	6	12	6	32
	332 Fangal	May 2002	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	432 Fangal	Sept. 2002	6	2	4	2	6	20
	532 Fangal	May 2003	4	2	3	4	3	16
	133 Los Alfaques	May 2001	4	2	3	3	6	18
	233 Los Alfaques	Sept. 2001	4	14	6	3	3	30
	333 Los Alfaques	May 2002	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	433 Los Alfaques	Sept. 2002	12	4	4	2	3	25
	533 Los Alfaques	May 2003	4	4	3	4	3	18
	134 Barcelone	May 2001	10	12	12	3	6	43
	234 Barcelone	Sept. 2001	12	8	6	3	3	32
	334 Barcelone	May 2002	nd	nd	nd	nd	nd	nd
434 Barcelone	Sept. 2002	12	7	4	2	3	28	
534 Barcelone	May 2003	12	4	6	10	3	35	

Figure 1: Contribution of each biomarker for each site studied during Beep cruises 2001-2003

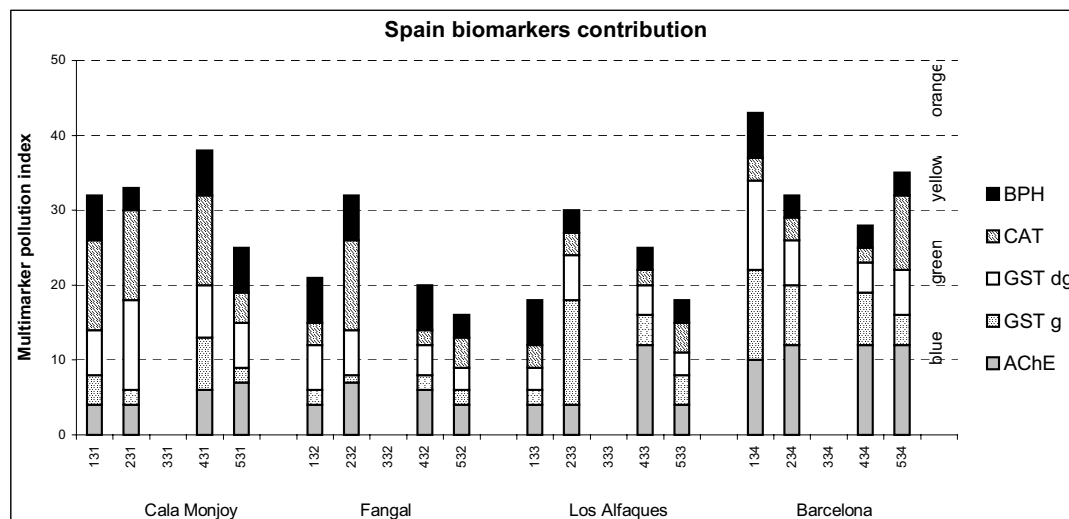
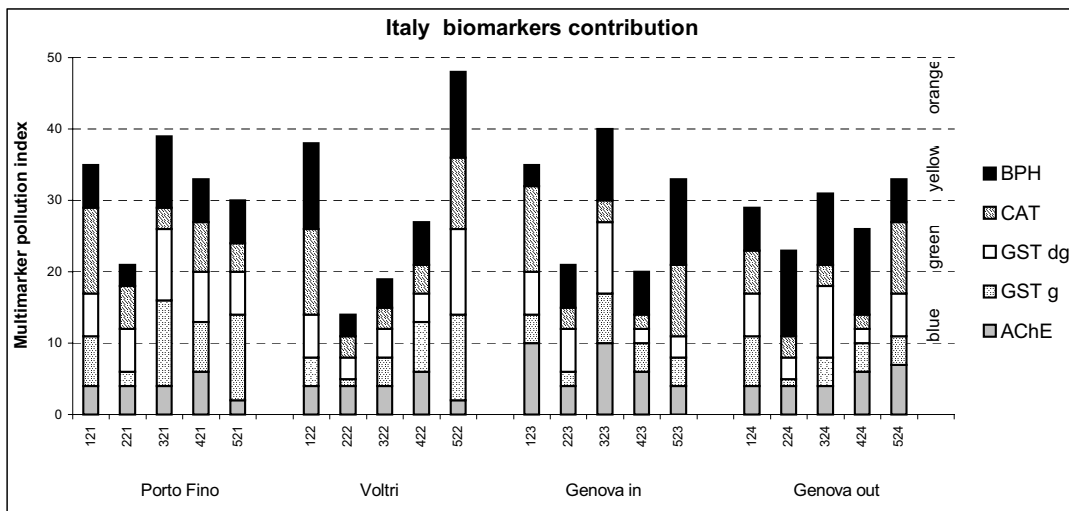
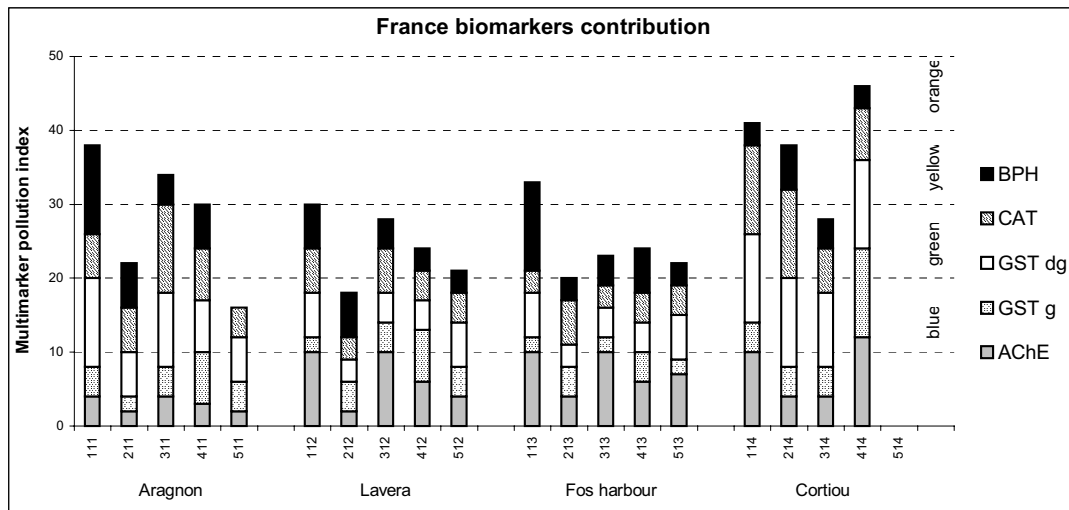
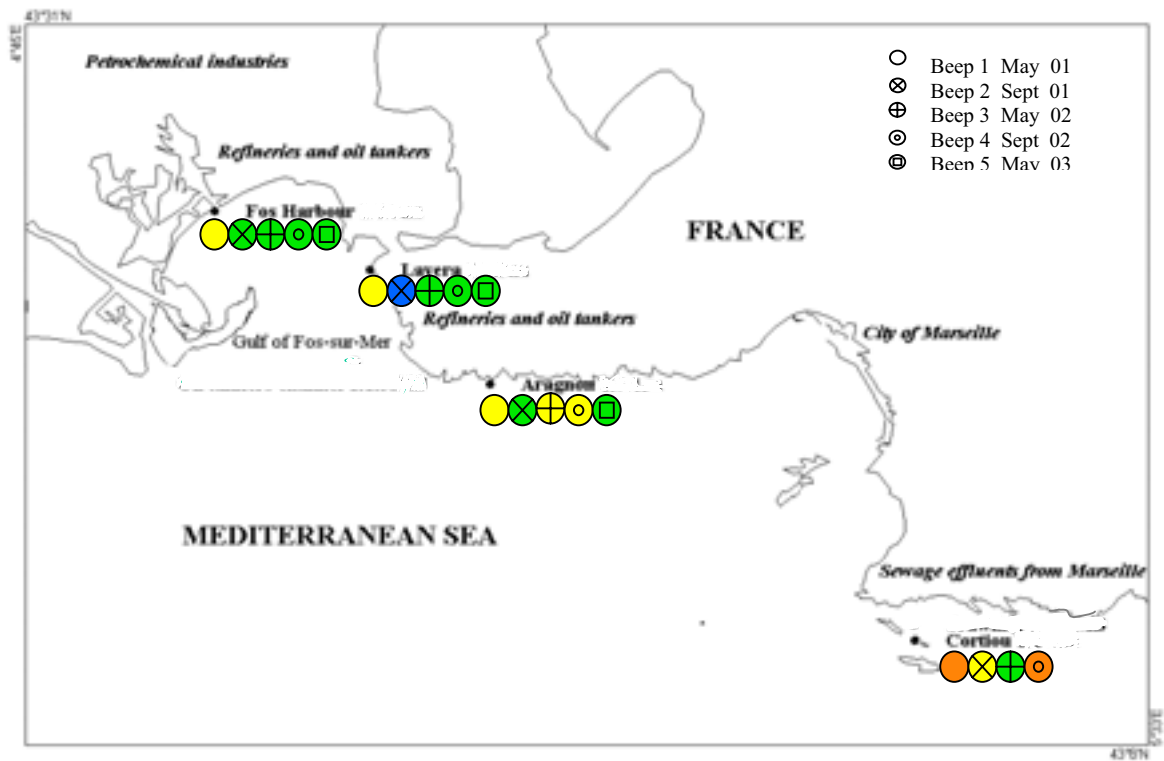
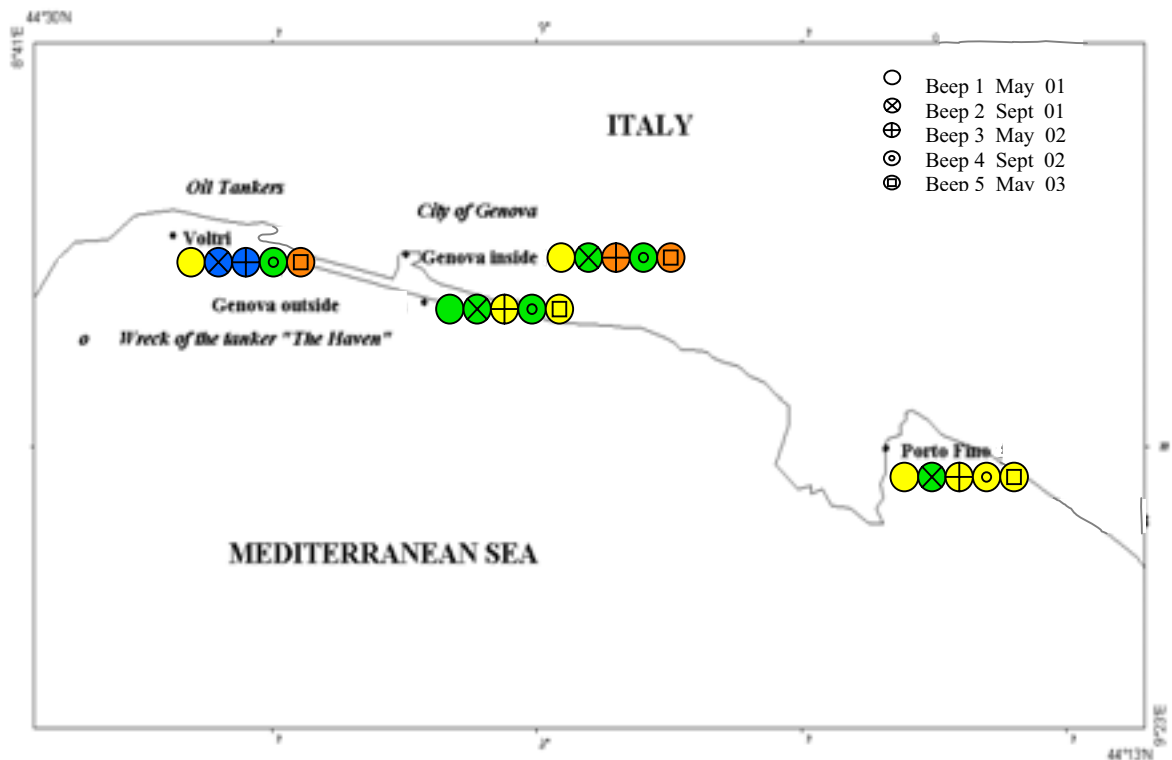


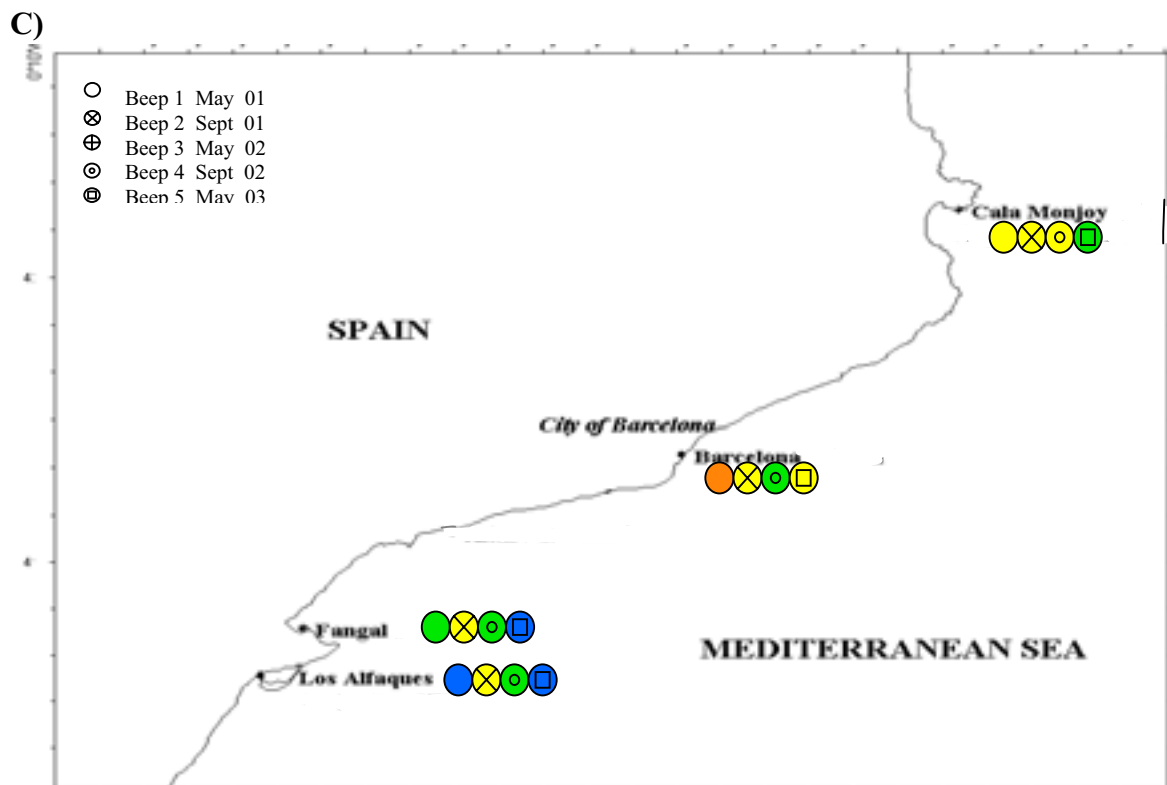
Figure 2: Trends of multimarker pollution index (MPI) in working sites selected in France (A), Italy (B) and Spain (C) during the five BEEP cruises.

A)



B)





Discussion

Biomarkers are used increasingly in monitoring programs 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, further, 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 on the basis of 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 programs

In 1999, Moore *et al.* reported upon 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 marine pollution (RAMP) programme developed by scientists from Plymouth University, UK (Wells *et al.*, 2001) has been in operation in Brasil for 3–4 years. Local scientists received training in the easy to use, inexpensive and robust procedures.

Though programs 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 may be utilized 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 procedure to select appropriate biomarker of exposure able to discriminate hot spots and multiexposure effects (discriminatory analysis).

Burgeot *et al.*, (1996) used several biomarkers to assess biological and genotoxic effects of marine pollutants in the northwestern Mediterranean Sea. A simple method summarizing biomarker responses was developed, thereby aiding interpretation. These authors used star plots to display results for a range of biomarkers and 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 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 we have developed the MPI approach in order to give decision makers enough information expressed in a simplified form (pollution scale, Narbonne *et al.*, 1999). Pollution scale is now expressed as colored scale easily used for mapping pollution. This made it possible for 4000 km of north coast of Mediterranean

coastline to be surveyed (BIOMAR and BEEP programs). MPI procedure has been disseminated to other countries, especially from North Africa (Morocco and Tunisia).

However, it is generally reported the difficulty to interpret 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 individual contribution to MPI, was used to identify the class of contaminant impacting aquatic environment.

It is very difficult to find any specific examples in the literature of failures of biomarker programs. Undoubtedly failures have occurred but these remain unreported. This is perhaps a reflection of the lack of general acceptance of biomarkers into routine monitoring programs (Handy *et al.*, 2003). If MPI procedure appeared well adapted to detect pollution gradients, trends measured in hot spots (Cortiou, Barcelona, Genova), indicating transitory decrease in pollution index, suggest false negative response in highly polluted sites. In this case, low enzymatic activity was not related to low pollution level but to acute toxicity inducing decreased cellular metabolism. Selection of nonspecific biomarkers indicating acute toxic effect may be tested in order to be integrated in MPI calculation.

Acknowledgements

EU (BEEP project, contract EVK3-CT2000-00025) is acknowledged for financial support, IFREMER for shipping facilities and G. Bocquéne, T. Burgeot for AChE and BPH biomarker measurements.

References

ADAMS, S.M., BEVELHIMER, M.S., GREELEY, M.S., DANIEL, Jr., LEVINE, A. and THE, S.J. (1999), Ecological risk assessment in a large river-reservoir : 6. bioindicators of fish population health. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, (4), 628-640.

ADAMS, S.M. and RYON, M.G. (1994), A comparison of health assessment approaches for evaluating the effects of contaminant-related stress on fish populations. *J. Aquat. Ecosys. Health* 3, pp. 15-25.

BAYNE, B. L., CLARKE, K. R. AND GRAY, J. S. (1988), Biological effects of pollutants: Results of a practical workshop, Oslo, Norway. *Marine Ecology Progress Series*, 46.

BELIAEFF, B. and BURGEOT, T. (2002), Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 21: 1316-1322.

BOQUENE, G., GALGANI, F. AND TRUQUET, P. (1990), Characterisation and assay for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. *Marine Environmental Research*, 30, 75-89.

BURGEOT, T., BOCQUÉNÉ, G., PORTE, C., DIMEET, J., SANTELLA, R.M., GARCIA DE LA PARRA, L.M., PFHOL-LESZKOWICZ, A., RAOUX, C. and GALGANI, F. (1996), Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser* 131: 125-141.

BUEGE, J. A. AND AUST, S. D. (1978), Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 50, 302-310.

CHEVRE, 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 of oxygen radical research*, Greenwald, R.A. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, 283-284.

ELLMAN, G. L., COURTNEY, K. D., ANDRES, V. AND FEATHERSTONE, R. M. (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 J. F. AND 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, 38, 379-387.

GOLDBERG, E. D., BOWEN, V. T., FARRINGTON, J. W., HARVEY, G., MARTIN, J., PARKER, P. L., RISEBOURG, R. AND ROBERTSON, W. (1975), the Mussel Watch. *Marine Pollution Bulletin*, 5, 101-126.

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. *Biomarkers* 12: 331-343.

HUGGETT, R. J., KIMBERLE, R. A., MEHRLE, P. M. JR AND BERGMAN, H. L. (1992), *Biomarkers, Biochemical, Physiological and Histological Markers of Antropogenic Stress* (Boca Raton, Florida: Lewis Publishers)

LABROT, F., RIBERA, D., SAINT DENIS, M. AND 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.

LAFONTAINE, Y., GAGNÉ, F., BLAISE, C., COSTAN, G., GAGNON, P. and CHAN, H.M. (2000), Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquat. Toxicol.* 50: 51-71.

LIVINGSTONE, D. R. (1991), Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. In *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, R. Gilles Ed. (Berlin: Springer-Verlag), 7, 45-185.

LOWRY, O. H., ROSENBROUGH, N. J., FARR, A. Z. L. AND RANDALL, R. J. (1951), Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.

MC CARTHY, J. F. AND SHUGART, L. R. (1990), *Biomarkers of Environmental Contamination* (Boca Raton, Florida: Lewis Publishers)

MICHEL, X., SALAUN, J. P., GALGANI, F. AND NARBONNE, J. F. (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, M.N., WADE, T., WEDDERBURN, R.J., LOWE, D.M., BALASHOV, G., BUYUKGUN-GOR, H., DAUROVA, Y., DENG, Y., KOSTYLEV, E., MIHNEA, P.E., MONCHEVA, S., TABAGARI, S., CIOCAN, C., OZKOC, H. and DEPLEDGE, M.H. (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 United Nations Publications, New York, 279-292.

NAJIMI, S., BOUHAIMI, A., DAUBEZE, M., ZEKHNINI, A., PELLERIN, J., NARBONNE, J. F. AND 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, 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*, 100C, 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.

PELLERIN-MASSICOTTE, J. (1994), Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine bivalves. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 3, 101-111.

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 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, M. L. AND NARBONNE J. F., 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. Athens, Greece: UNEP-(OCA)/MED WG. 132/7.

WELLS, P.G., DEPLEDGE, M.H. BUTLER, J.N., MANOCK, J.J. and KNAP, A.H. (2001), Rapid Toxicity Assessment and Biomonitoring of Marine Contaminants. Exploiting the Potential of Rapid Biomarker Assays and Microscale Toxicity Tests. *Mar. Pollut. Bull.* 42: 799-804.

**CHAPITRE III : APPLICATION AU
MILIEU DULÇAQUICOLE**

Les poissons, représentés par plus de 21 000 espèces dulçaquicoles ou marines, peuplent la quasi-totalité des systèmes aquatiques, y compris ceux qui sont les plus fortement pollués. Ils occupent des aires de répartition géographique souvent vastes et vivent assez longtemps pour intégrer des paramètres très diversifiés et fluctuants de l'environnement. Leur choix en tant qu'espèce cible est fortement recommandé par les instances européennes, nord-américaines (European Inland Fisheries Advisory Commission, US-EPA) et internationales (OCDE) pour les études de toxicologie de l'environnement (Solbe, 1987).

La mesure de biomarqueurs comme les activités de biotransformation chez le poisson, est susceptible de fournir des informations sur les niveaux d'exposition, sur la biodisponibilité et sur les effets biologiques précoces de substances présentes dans les écosystèmes aquatiques.

Au cours de cette étude, nous avons appliqué une approche biologique en utilisant des poissons d'eau douce collectés dans le Sud-Ouest de la France sur lesquels ont été mesurées des activités de biotransformations (EROD, GST et AChE).

Parallèlement, les polychlorobiphényles (PCBs), les pesticides, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), les métaux lourds ont été dosés dans les tissus des poissons et le sédiment. L'étude de ces quatre familles de composés suffisamment différents permet d'appréhender de manière assez complète la problématique des contaminants organiques et inorganique dans l'écosystème.

Ainsi, dans cette partie, seront abordés successivement les outils de surveillance de l'environnement, l'état de la contamination des organismes dans quelques écosystèmes (sites choisis), et leurs effets sur les organismes en relation avec la concentration de chaque groupe de contaminants dans les sites retenus.

I Matériels et méthodes

1 Démarche expérimentale

Le choix du site de référence s'est fixé sur le lac de Pareloup du Bassin Sud Ouest

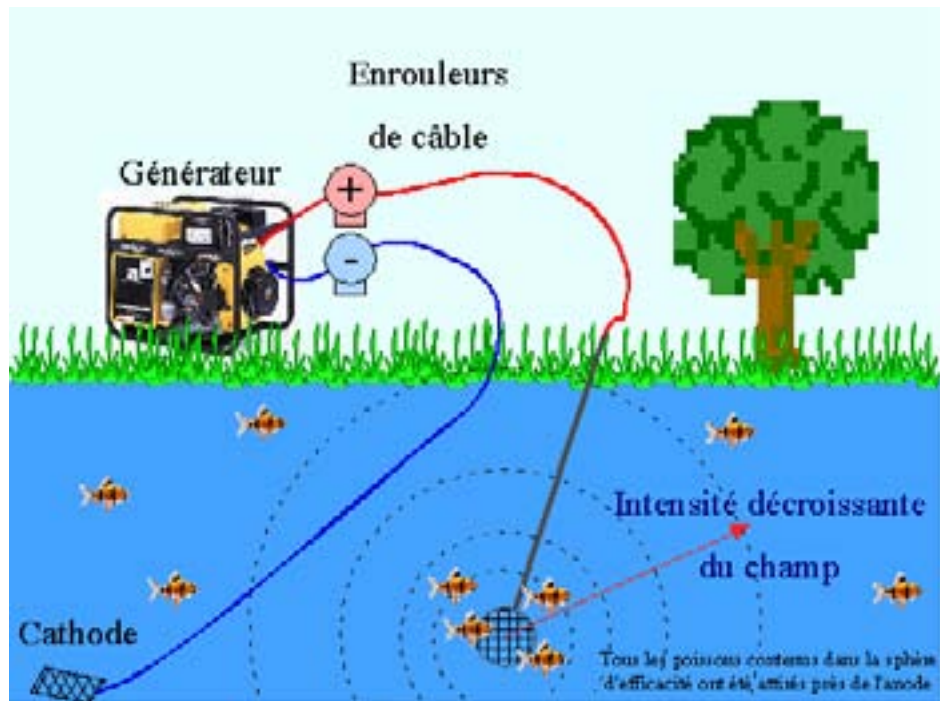


Figure 1 : Pêche électrique pendant les campagnes de prélèvement FISHBIO

de France en raison de la présence des 3 espèces de poissons retenues pour l'étude et aussi de la qualité de ces eaux. Celui des autres sites a été déterminé en fonction de leur contamination par diverses sources de pollution déjà identifiées (industrielle, agricole, rejets urbains,...).

- ❖ Le nombre d'individus par site de prélèvement a été fixé à au moins dix poissons par espèce (femelles et mâles confondus). Ces prélèvements ont été réalisés par la pêche électrique par le Conseil Supérieur de la Pêche (CSP) au cours de l'été 2001 (*annexe 1*) (Figure 1).
- ❖ Le foie des poissons a été prélevé pour le dosage des activités EROD, CAT, GST, ainsi que pour l'analyse chimique de PCBs, HAPs et métaux.
- ❖ Un prélèvement de muscle et de cerveau est effectué pour le dosage de l'activité AChE et pour l'analyse chimique de PCBs, HAPs et métaux.

2 Les espèces étudiées

Trois espèces de poissons ont été retenues pour cette étude : le chevaine, le barbeau et la truite (Figure 2). Ils sont présents dans une aire géographique étendue et ont un régime carnivore, ce qui les place au sommet de la chaîne trophique dans les écosystèmes concernés.

a)- Le chevaine

Le chevaine (*Leuciscus cephalus*, Linné, 1758) est très largement présent dans toutes les rivières françaises. On le rencontre dans les eaux claires, courantes ou stagnantes, mais il s'accommode d'un large éventail de conditions écologiques. Très ubiquiste, il est présent dans toute l'Europe hormis l'Irlande (Philipart, 1972). Les chevaines vivent en bandes plus ou moins nombreux. On le trouve aussi en milieu lacustre, y compris dans certains lacs d'altitude (+ de 2000 m). Il résiste assez bien à la pollution.

b)- Le barbeau

Le barbeau fluviatile (*Barbus barbus*, Linné, 1758), le plus grand cyprinidé d'Europe, est caractéristique des rivières de la zone à barbeau (Huet, 1949) : rivières à courant assez rapide (espèce rhéophile), à fond caillouteux, graveleux où l'eau est fraîche et bien oxygénée.

Son aire de distribution s'étend sur la majeure partie de l'Europe occidentale (extension méridionale limitée aux bassins du Rhône et du Danube). Il n'a jamais été détecté en Scandinavie (Philippart, 1987). Relativement sédentaire en dehors de la période de frai, le barbeau peut être amené à se déplacer considérablement (10 km) en période de reproduction (Baras, 1992).

c)- La truite arc-en-ciel

Dans son aire d'origine, la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792), est une espèce anadrome non obligatoire colonisant les rivières, les lacs et la mer. Son écologie, peu connue dans notre pays en raison de sa rare implantation en milieu naturel (reproduction très rare), est très semblable à celle de *Salmo trutta*. Sa distribution est liée à deux facteurs : couvert et profondeur. Cependant, elle se distingue de *S. trutta* par une colonisation de la zone à ombre, une reproduction printanière, un meilleur taux de croissance ainsi qu'une moindre sensibilité à la température et à la qualité de l'eau. L'espèce, originaire de la côte ouest des Etats-Unis (Montagnes Rocheuses) a été largement introduite au XIXème siècle dans toute l'Europe où elle se maintient naturellement dans quelques régions seulement. Introduite en France en 1879, sa naturalisation est limitée à quelques rares cours d'eau (voire lacs) des Pyrénées et des Alpes. Elle fait l'objet d'un élevage intensif à des fins halieutiques (déversement dans les lacs et les cours d'eau) et surtout commerciales en eau douce.



Chevaine (*Leuciscus cephalus*)



Barbeau (*Barbus barbus*)



Truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)

Figure 2: Les espèces de poisson sélectionné pour notre étude.

3- Localisation des sites étudiés

Les campagnes de prélèvement de poissons ont été effectuées sur cinq rivières :

Rivières	Sites de prélèvement	N° Station	Date de prélèvement
Garonne	Aval du pont de Clarac	5311010	juil-01
	Pont de Montespan	5311003	juil-01
	Pont vieux de Bourret	5821002	sept-01
Tarn	Millau	5121012	sept-01
	Pont de Rabastens	5811003	juil-01
	Aval du barrage de Ste-Livrade, La Garde	5821001	sept-01
Dordogne	Aval du seuil de Tauriac	5461002	août-01
	Aval du pont de Le Fleix	5331005	juin-01
Seudre	Saint-André de Lidon	0517*	sept-01
Gave de Pau	Lahontan	0564*	oct-01

Tableau 1 : Les sites de prélèvements sur les cinq rivières



Figure 3 : Carte des sites de prélèvement dans le Bassin de Sud Ouest

* Pareloup : site de référence (trois espèces).

4- Prélèvement et préparation des échantillons sur le terrain

Les poissons sont prélevés par le CSP sur les sites choisis Figure 8 au cours de l'été début automne 2001. Ces prélèvements sont réalisés au cours des missions de recensement de la faune ichtyologique du CSP en utilisant un courant électrique faible, qui entraîne l'étourdissement momentané des poissons. Les animaux prélevés pour le besoin de l'étude sont pesés et mesurés dans leur longueur (*annexe 1*). Ils sont ensuite disséqués et triés en fonction de leur sexe. La détermination du sexe se fait de manière empirique par la couleur et la taille des gonades. Du fait du petit nombre (ou absence) de femelles prélevées sur chaque site, les valeurs moyennes des enzymes sont exprimées pour les 2 sexes confondus.

Le foie, la bile, l'encéphale et le muscle sont prélevés systématiquement, la bile n'est prélevée que lorsque la taille de l'individu le permet. Les organes et tissus prélevés sont conservés dans la glace carbonique pour leurs analyses ultérieures.

Deux litres et demi d'eau sont prélevés sur chaque site afin de réaliser les analyses chimiques de pesticides. Du sédiment (500 g) et du muscle de poisson (50g) sont prélevés pour l'analyse chimique des HAP, des PCB, et des métaux (Figure 4).

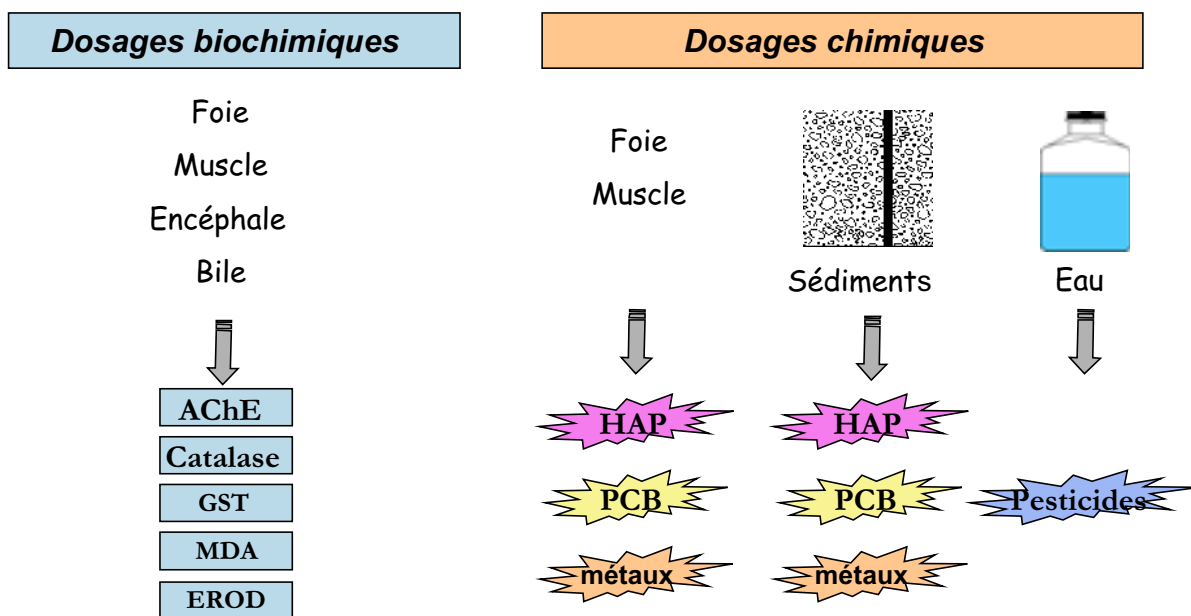


Figure 4 : Utilisation des tissus de poisson, des sédiments et de l'eau prélevés sur les sites pour les différents dosages biochimiques et chimiques.

5- Analyses chimiques

a)- Recherche des métaux dans les sédiments et les tissus de poissons

Après lyophilisation les sédiments (0.5g) sont traités par un mélange acide nitrique/acide chlorhydrique (3v/1v) et placés sous l'action des micro-ondes focalisées à 60 W pendant 15 minutes, puis sont repris dans 25 ml d'eau milliQ.

Pour le muscle et le foie des poissons on utilise de 0.5 g de tissus lyophilisés sur lesquels on fait agir successivement de l'acide nitrique puis de l'eau oxygénée sur une plaque chauffante à reflux pendant 2 heures à 80°C. Le résidu est repris dans 25 ml d'eau milliQ.

L'analyse des métaux se fait par ICP-MS (Hewlett Packard 4500) qui utilise le rhodium comme étalon interne. Une calibration externe (de 0 à 100µg/litre) est effectuée pour chaque métal. Les échantillons sont dilués au 1/10 ou au 1/100 en fonction de l'élément à déterminer.

b)- Recherche des HAP et des PCB dans les sédiments

Les échantillons de sédiments sont lyophilisés et conservés à température constante à l'abri de la lumière. La prise d'essai pour l'analyse dépend de la teneur en contaminants organiques et de la quantité de matière échantillonnée. Cette quantité extraite varie de 1 à 10 grammes de matière sèche.

Le protocole d'extraction, de purification et d'analyse est présenté Figure 5. L'échantillon est extrait par chauffage micro-ondes (30W, 10 minutes) en utilisant comme solvant extracteur le dichlorométhane. L'échantillon est auparavant humidifié par 30% en poids d'eau (de façon à améliorer les rendements d'extraction). Des étalons internes sont rajoutés à la matrice avant l'extraction pour pouvoir doser les composés recherchés par la méthode d'étalonnage interne. Ces étalons internes sont des composés aromatiques deutérés tri-aromatique, tétra-aromatique, penta-aromatique et hexa-aromatique pour doser les composés aromatiques et des polychlorobiphényles absents des milieux naturels (PCB 30, 155, 201) et l'octachloronaphtalène pour doser les polychlorobiphényles.

Après extraction, une première purification de l'extrait organique est effectuée par attaque acide sous champs micro-ondes (acide sulfurique 18N). L'extrait organique

purifié obtenu est désoufré sur cuivre activé puis chromatographié sur micro-colonne de silice.

L'échantillon purifié est alors injecté en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) pour quantifier les composés aromatiques recherchés. Il est également analysé par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons (CG/DCE) pour quantifier les polychlorobiphényles. Le dosage des PCB est validé par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Le protocole global est validé en utilisant deux matrices de référence, le SRM1941a et le SRM1944 (sédiments marins fournis par le NIST, Gaithersburg, MD, USA). Au cours des séries d'analyse, une matrice de référence du laboratoire est utilisée (sédiment de rivière). Des blancs de protocole (HAP et PCB) sont effectués pour chaque série d'analyse et les concentrations calculées pour les HAP et PCB tiennent compte des corrections par rapport aux blancs de protocole.

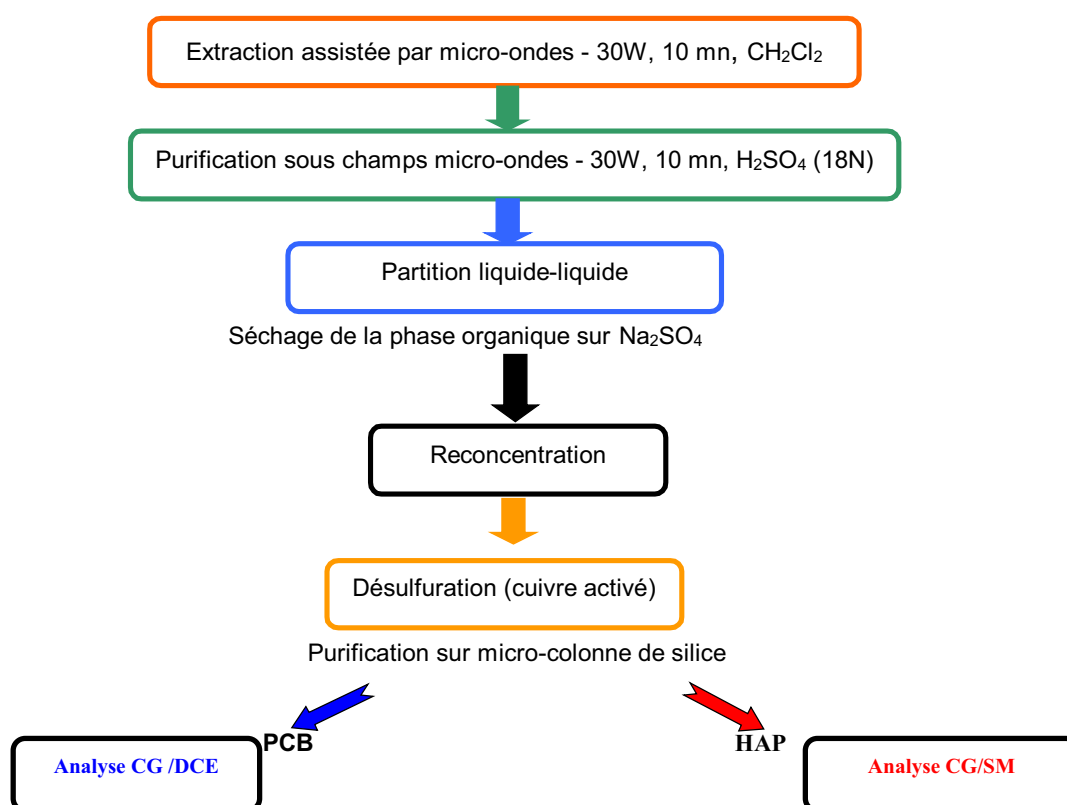


Figure 5 : Protocole d'analyse des HAPs et des PCBs

Tout le matériel de laboratoire, en verre, est soigneusement lavé puis chauffé toute une nuit à 450°C (ce qui permet d'enlever toutes traces organiques). Les solvants utilisés sont de qualité analyse. Les tissus sont lyophilisés et broyés avant extraction.

c)- Recherche des HAP dans les poissons

Les tissus biologiques, avant extraction, sont dopés avec des étalons internes aromatiques perdeutérés (naphtalène d8, dibenzothiophène d8, phénanthrène d10, fluoranthène d10, chrysène d12, benzo(a)pyrène d12, benzo(e)pyrène d12, benzo(k)fluoranthène d12, benzo(ghi) pérylène d12. Les échantillons sont extraits par micro-ondes en utilisant comme solvant le dichlorométhane. L'extrait organique est reconcentré. L'extrait organique est ensuite fractionné en fraction saturée et fraction aromatique (séparation sur micro-colonnes d'alumine/silice).

Les fractions aromatiques sont analysées directement par chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse (CG/SM) en mode d'acquisition par sélection d'ions (ions moléculaires des composés quantifiés). La quantification est effectuée par étalonnage interne en utilisant les composés aromatiques perdeutérés. Un étalonnage des appareils est effectué en utilisant des solutions étalons de composés perdeutérés et des solutions étalons de composés natifs (SRM 2260 NIST, Gaithersburg, MD, USA).

Des blancs de protocole sont réalisés pour chaque série d'expérimentation de façon à s'affranchir d'éventuelles contaminations.

Analyses par CG/SM : Les analyses sont effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse HP 6890 (Agilent Technology, USA) équipé d'un injecteur splitless (délai de purge 1 mn, débit de purge 60 ml/mn, mode splitless pulsé). L'injecteur est maintenu à 270°C. Le programme de température du four est le suivant : 50°C (2 mn) à 290°C (20 mn) à 5°C/mn. Le gaz vecteur est l'hélium à un débit constant de 1 ml/mn. La colonne capillaire utilisée est une colonne HP5-MS (Agilent Technology, USA) : 30 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm épaisseur de film. Le chromatographe en phase gazeuse est couplé à un spectromètre de masse MSD 5973 (impact électronique : 70 eV, voltage : 1800 V) opérant en mode de sélection d'ions (SIM) avec les ions moléculaires de chaque composé à doser à 1 scan/s. La température de l'interface est

de 290°C.

Les HAP sont quantifiés par étalonnage interne par rapport à des HAP perdeutérés; les facteurs de réponse des différents composés sont mesurés en injectant une solution étalon, SRM 2260, contenant les HAP à des concentrations certifiées (NIST, Washington, MD, USA) à laquelle ont été rajoutés les HAP perdeutérés utilisés comme étalons internes. Les abréviations utilisées pour les composés mesurés sont données Tableau 2

Abéviations	HAP
An	Anthracène
BaA	Benz(a)Anthracène
BaP	Benzo(a)Pyrène
BFs	Benzo(b+k+j)Fluoranthène
BP	Benzo(g,h,i) Pérylène
Chrys	Chrysène
DaA	Dibenz(a,h)Anthracène
Fluo	Fluoranthène
IP	Indéno(1,2,3-cd)Pyrène
Phe	Phénanthrène
Pyr	Pyrène

Tableau 2 : Abréviations utilisées pour les HAP dosés

Les résultats des dosages sont exprimés sous la forme de concentrations en ng de composés par gramme de matrice sèche (après lyophilisation).

d)- Recherche des PCB dans les poissons

L'échantillon est extrait par chauffage micro-ondes (30W, 10 minutes) en utilisant comme solvant extracteur le dichlorométhane. Des étalons internes sont rajoutés à la matrice avant l'extraction pour pouvoir doser les composés recherchés par la méthode d'étalonnage interne. Ces étalons internes sont des polychlorobiphényles absents des milieux naturels (PCB 30, 155, 201) et l'octachloronaphtalène pour doser les polychlorobiphényles.

Après extraction, une première purification de l'extrait organique est effectuée par attaque acide (acide sulfurique 36N). L'extrait organique purifié obtenu est désoufré sur cuivre activé puis chromatographié sur micro-colonne de silice.

L'échantillon purifié est injecté en chromatographie en phase gazeuse couplée à un

détecteur à capture d'électrons (CG/DCE) pour quantifier les polychlorobiphényles.

Des blancs de protocole sont effectués pour chaque série d'analyse et les concentrations calculées pour les PCB tiennent compte des corrections par rapport aux blancs de protocole.

Analyses par CG/DCE : Les analyses sont effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse HP 5890 (Hewlett Packard, USA) équipé d'un injecteur splitless (délai de purge 1 mn, débit de purge 60 ml/mn, mode splitless pulsé). L'injecteur est maintenu à 270°C. Le programme de température du four est le suivant : de 60 °C (2 mn) à 120 °C (5 mn) à 6 °C/mn, puis à 2°C mn jusqu'à 280°C (20 mn). Le gaz vecteur est l'hélium à un débit constant de 1 ml/mn. La colonne capillaire utilisée est une colonne HP5-MS (Agilent Technology, USA) : 60 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm épaisseur de film. Le chromatographe en phase gazeuse est couplé à un détecteur à capture d'électrons.

Les PCB sont quantifiés par étalonnage interne par rapport aux PCB rajoutés. Les facteurs de réponse des différents composés sont mesurés en injectant une solution étalon, contenant les PCB à doser et les PCB étalons. Les PCB dosés sont les suivants : PCB 28, PCB 52, PCB 101+90, PCB 118, PCB 153, PCB 138+160 et le PCB 180. Les résultats des dosages sont donnés sous la forme de concentrations en ng de composés par g de poids de matrice sèche (après lyophilisation).

e)-. Recherche des pesticides dans l'eau

Les pesticides sont dosés en phase aqueuse (phase dissoute) par extraction sur disque BAKEREBOND Speedisk™ DVB (divinylbenzène). Deux litres d'eau sont filtrés puis passés sur un speeddisk™. Ce dernier est séché et les pesticides sont récupérés en faisant éluer 9ml d'acétonitrile. Les extraits sont séchés sur sulfate de sodium, reconcentrés puis repris dans l'iso-octane pour être analysés par GC/MS en mode d'ions sélectifs. Les pesticides sont dosés par étalonnage interne par rapport à la benzo(h)quinoléine rajoutée avant l'étape d'extraction sur disque.

Des blancs de protocoles sont réalisés pour chaque série d'analyse pour contrôler d'éventuelles contaminations. Dans le cadre de ces analyses, aucune contamination n'a été mise en évidence. Le protocole est validé sur une eau pure supplémentée avec les différents pesticides.

Les composés recherchés sont l'atrazine, la simazine et leurs produits de dégradation, ainsi que le carbaryl et le carborufan.

3 Dosage des marqueurs biochimiques

Les fractions subcellulaires (fraction post-mitochondriale et microsomes) des différents tissus et organes prélevés, nécessaires au dosage des biomarqueurs, sont préparées extemporanément.

Quatre marqueurs biochimiques ont été mesurés : l'activité AchE, l'activité GST, l'activité CAT et l'activité EROD.

Pour ces trois activités la méthode utilisée est la même utilisée pour les moules. (voir chapitre 1)

Pour l'activité AChE le dosage a été mesuré sur la fraction S9 du cerveau et du muscle.

L'activité EROD a été mesurée sur la fraction microsomique (S105000) de foie. Cette méthode repose sur la détection de la fluorescence de la résorufine, produit de transformation de la 7-éthoxyrésorufine sous l'action du cytochrome P450 1A en présence de NADPH et d'oxygène (Burke & Meyer, 1974) (Figure 6).

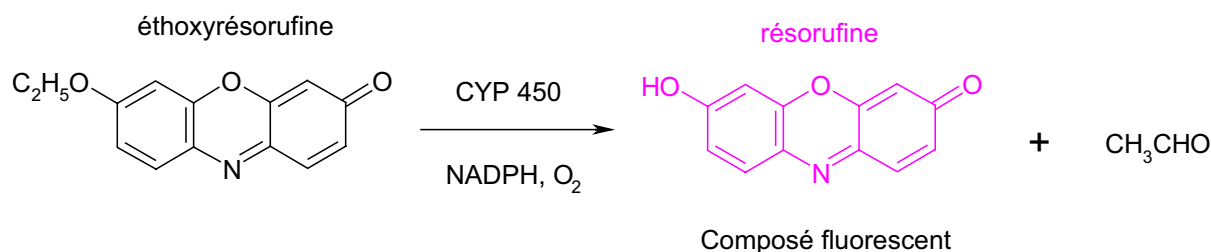


Figure 6 : Principe du dosage de l'EROD

Ce dosage est effectué à l'aide d'un fluorimètre lecteur de microplaques en mode cinétique à 25 °C pendant 10 mn. L'activité est calculée par référence à une gamme de résorufine.

Toutes les activités enzymatiques sont réalisées en triplicats pour chaque échantillon.

Le dosage **des protéines** a été effectué selon la méthode de Bradford *et al.* (1976) adaptée en microplaque utilisant le réactif Bio-Rad (Laboratoires Bio-Rad GmbH). Ce dernier se lie aux protéines en déplaçant son pic d'absorption maximum à 595 nm. La

quantité de protéines est déterminée par comparaison à une gamme d'albumine sérique de bovin (BSA, Sigma-Aldrich).

Les métabolites des HAPs dans la bile : La méthode de Aas en spectrographie fluorescente synchrone (SFS) employée dans cette étude, utilise une différence de 42 nm entre les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission ($\Delta\lambda$). pour détecter des métabolites de types naphtalène, pyrène et benzo(a)pyrène (Aas *et al.*, 2000). Les composés parents des HAP ne sont pas utilisés comme standards, c'est pour cela que l'on considère cette méthode comme semi-quantitative et les taux sont exprimés en équivalent du standard choisi.

Le taux de métabolites mesuré est rapporté à la concentration du pigment biliverdine dans la bile qui dans les conditions de jeûne est proportionnel au taux de protéines biliaires. Les résultats sont exprimés en unités de fluorescence.

4. Traitement statistique des données

Pour évaluer la signification des variations des paramètres mesurés sur les différents sites nous avons utilisé des analyses de variance suivies de tests de Tuckey adaptés ou non à des échantillons d'effectifs différents suivant les cas.

Des analyses discriminantes ont également été réalisées dans le but de tester la discrimination des sites avec et sans classement en fonction de leur contamination et en utilisant l'ensemble des paramètres biochimiques. Cette méthode permet également de déterminer quels paramètres participent le plus à la discrimination 'biochimique' des sites.

Une méthode d'attribution d'indices globaux de pollution a été testée. Cette méthode s'appuie sur le calcul du rapport de l'amplitude de réponse des biomarqueurs sur l'intervalle de confiance de la moyenne (ICM à 5%) (Narbonne *et al.*, 1999) selon la formule:

$$ICM = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \times t$$

Où σ est l'écart type calculé sur l'ensemble des valeurs du marqueur considéré, n le nombre de réplicats pour chaque site, et t la valeur du t de Student pour $\alpha = 5\%$ et $n-1$ degrés de liberté de. Ces calculs permettent dans certains cas d'attribuer aux

sites étudiés un score autant plus élevé que le niveau de pollution est important et ainsi de classer les degrés de contaminations généralement sur cinq niveaux.

II Résultats

1- Mesure des marqueurs biochimiques

Les moyennes et les écarts types concernant les marqueurs biochimiques des valeurs observées sur chaque site et chaque espèce sont présentés sous forme de tableau. Ils sont discutés plus en détail dans l'article 2. Seule les résultats des analyses chimiques sont discutés.

2-Dosage chimiques.

a)- Au niveau du sédiment

Les valeurs des concentrations en HAP et PCB dosées dans les sédiments sont présentées dans le tableau et Tableau 3. Des HAP ont été détectés sur tous les sites. Les plus fortes concentrations en HAP totaux ont été mesurées dans les sédiments provenant du site de Clarac, suivie par Lahontan. De fortes concentrations en PCB ont également été mesurées dans les sédiments provenant des sites Lahontan, mais encore plus surprenant dans les sédiments du site de référence de Capelle V .

Espèces	Sites prélèvement	PCB totaux (ng/g de poids sec)		HAP totaux (ng/g de poids sec)		Métaux totaux ($\mu\text{g/g}$ pds sec)	
		<10,	[10;50], >50	<100,	[100; 500], >500	<15000,	[15000;30000], >30000
<i>Chevaîne</i>	Capelle V	64,0		586,1		11928,61	
	St André	10,2		365,9		NP	
	Le Fleix	2,6		334,1		25743,87	
	La Garde	9,6		460,6		11212,89	
	Lahontan	19,2		952,9		37855,37	
	Tauriac	2,3		117,9		NP	
<i>Truite</i>	Pareloup	5,6		63,2		NP	
	Clarac	4,1		1668,0		52753,6	
	Millau	3,2		258,2		23319,27	
	Montespan	6,7		299,8		46513,28	
<i>Barbeau</i>	Parloup	5,4		23,0		NP	
	Bourret	11,1		605,3		11346,81	
	Rabastens	NP		NP		16015,76	

Tableau 3: Concentrations en HAP, PCB et métaux dans les sédiments récoltés sur les différents sites de prélèvement pour les trois espèces de poissons

PCB : Plusieurs congénères ont été identifiés (8 congénères). Les concentrations individuelles sont comprises entre 2,6 ng/g de sédiment sec (Fleix) jusqu'à 64 ng/g (Capelle V). Ce sont les congénères les plus chlorés qui dominent le compartiment sédimentaire : les congénères hexachlorés (PCB 138 et PCB 153) et pentachlorés (101, 118, 105) représentent plus de 60% de la somme des PCB. Les abondances relatives des PCB présentent une empreinte caractéristique qui indique une source de contamination de même origine sur l'ensemble des sites.

Ces sédiments sont faiblement contaminés (Tableau 3) au regard des valeurs obtenues dans d'autres sites européens ou nord-américains : 70 ng/g de sédiment dans l'estuaire de la Seine (Munsch et al., 1997), de 30 ng/g à 150 ng/g sur les côtes méditerranéennes (Pierrard, 1996).

HAP : Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ont pour origine les divers processus de combustion ou de pyrolyse de la matière organique (industries, gaz d'échappement), les produits pétroliers, voire pour certains d'entre eux une origine naturelle (pérylène par exemple).

Les rapports moléculaires entre différents composés peuvent indiquer l'origine des HAPs dans l'environnement sédimentaire. Des indices tels que les rapports Fluoranthène/Pyrène proche de l'unité et le rapport Phénanthrène/Anthracène inférieur à 5 indiquent une origine essentiellement anthropique (processus de combustion d'origine industrielle). On notera plus particulièrement le site de Clarac où l'on observe une contribution pyrolytique importante (rapport Phénanthrène/Anthracène de 2,4) avec une concentration totale de HAP d'environ 1668 ng/g.

Les concentrations totales en HAP vont de 23 ng/g (Bourret) jusqu'à 1668 ng/g (Clarac). Ces niveaux nous permettent de qualifier ces sites comme moyennement contaminés pour les plus fortes valeurs. Ces valeurs sont à comparer à d'autres sites sédimentaires européens : environ 3000 ng/g pour l'estuaire de la Seine, 100 à 2000 ng/g pour le delta du Rhône (Munsch *et al*, 1997), de 20 à 4000 ng/g pour l'estuaire de la Gironde, avec une moyenne à 1500 ng/g (Budzinski *et al*, 1997).

Métaux : Les valeurs des concentrations en métaux totaux mesurées dans les sédiments des sites étudiés sont présentés dans le tableau 7. Les plus fortes concentrations sont mesurées au niveau de Lahontan, Clarac et Montespan, ces concentrations élevés étant essentiellement dues à la présence de Cadmium (Cd), Plomb (Pb), Zink (Zn), Nickel et Cuivre (Cu).

Le nickel est associé à la fabrication d'aciers inoxydables, et à la préparation d'alliages. La concentration moyenne dans les sédiments est de 15,19 µg/g de poids sec. Les sédiments récoltés de Clarac ont le taux de Nickel. Le plus élevé

Le cadmium (pigments, agents de polymérisation des plastiques) est présent dans une gamme de 0,44 à 1,68 µg/g de sédiment et une moyenne de concentration inférieure à 0,85 µg/g.

Le plomb et le cadmium sont les métaux dont la concentration varie le plus sur le Gave de Pau. Les sites dont les sédiments possèdent les concentrations les plus importantes sont Lahontan suivie par Clarac. Le plomb est utilisé en fonderie, imprimerie, fabrication de pigments, peintures et revêtement anticorrosion, ainsi que dans les batteries. On obtient dans les sédiments, prélevés au niveau de tous les sites d'échantillonnage une concentration moyenne de 45,37 µg/g. En comparaison avec une étude qui' a été faite en 1999 (Garrigues *et al.*, 1999) au niveau du Gave de Pau, dont la concentration est de l'ordre de 10µg/g, confirme la forte quantité que cette rivière a pu recevoir au bout de 3ans.

b)-Au niveau du poisson

PCB : Le dosage des PCB montre que, les PCB 138 et 153 sont les espèces retrouvées en plus grande quantité dans le muscle des trois poissons (Figure 7). On retrouve un taux important dans le muscle des chevaines pêchés sur le site de Lahontan. Les animaux prélevés sur le site de Bourret ont un taux très élevé de PCB dans les muscles. On peut remarquer que les taux mesurés dans les muscles des poissons augmentent au fur et à mesure que l'on se déplace vers l'aval de la Garonne (Clarac<Montespan<Bourret). Par contre pour le site de Pareloup les trois espèces de

poissons prélevés ont un taux voisin de PCB totaux (Tableau 4).

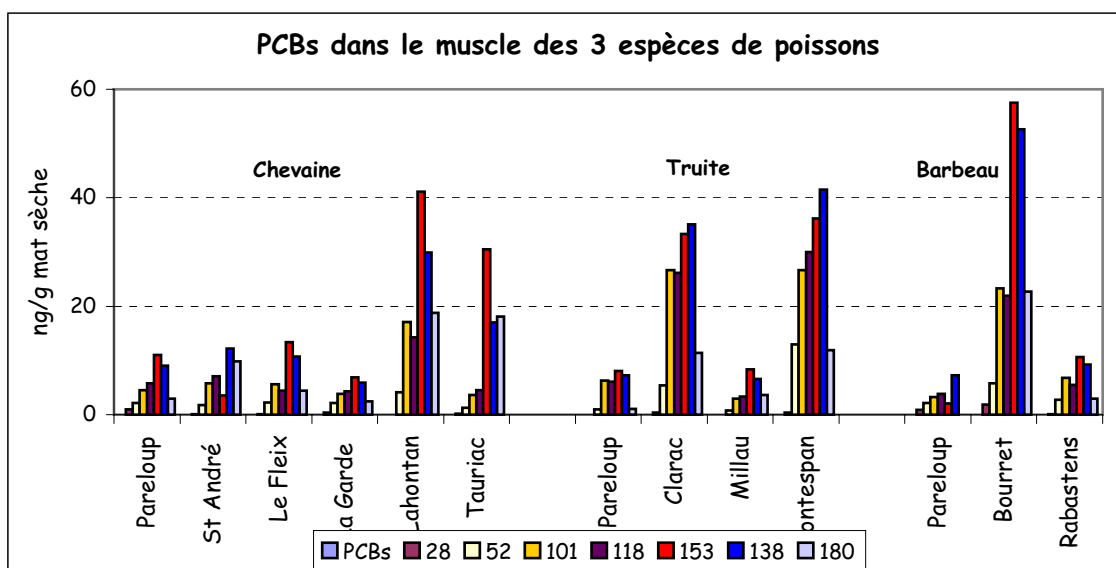


Figure 7: Les différentes PCB mesurés dans les muscles de poissons récoltés sur les différents sites de prélèvement.

Espèces	Sites prélèvement	PCB totaux (ng/g mat sèche)		HAP totaux (ng/g mat sèche)		Métaux totaux (µg/g pds sec)	
		Muscle	<50, [50;100], >100	Muscle	<10, [10;50] >50	Muscle	<50, [50;100], >100
Chevaïne	Capelle V	36,49		5,27		33,848	
	St André	40,33		3,31		81,54	
	Le Fleix	45,00		12,24		121,96	
	La Garde	26,00		9,30		116,89	
	Lahontan	125,40		51,47		63,75	
	Tauriac	75,22		4,66		96,86	
Truite	Pareloup	30		5,00		73,47	
	Clarac	138,43		19,00		70,56	
	Millau	25,70		5,42		58,85	
	Montespan	159,50		14,47		63,98	
Barbeau	Capelle V	19,55		9,33		101,33	
	Bourret	185,88		12,15		77,09	
	Rabastens	38		10,07		71,11	

Tableau 4 : Concentrations en HAP, PCB et métaux dans les muscles de poissons récoltés sur les différents sites de prélèvement.

Espèces	Sites prélèvement	PCB totaux (ng/g mat sèche)		HAP totaux (ng/g mat sèche)		Métaux totaux (µg/g pds sec)	
		Foie	<50, [50;100], >100	Foie	<10, [10;50] >50	Foie	<500, [500;1000], >1000
Chevaîne	Pareloup		70,0		10,50		88104
	St André		123,0		21,98		900,94
	Le Fleix		163,2		34,01		460,33
	La Garde		231,2		39,14		562,8
	Lahontan		277,7		134,65		156,76
	Tauriac		159,2		22,02		NP
Truite	Pareloup		45,0		36,24		124,17
	Clarac		65,1		14,17		856,04
	Millau		86,0		14,66		1474,92
	Montespan		95,3		28,26		52153
Barbeau	Pareloup		163,65		26,55		172186
	Bourret		42,75		22,69		799,52
	Rabastens		201,32		35,18		667,94

Tableau 5 : Concentrations en HAP, PCB et métaux dans les foies de poissons récoltés sur les différents sites de prélèvement.

HAP : Les concentrations en HAP mesurées dans le foie des poissons prélevés sur les 11 sites sont présentées dans le tableau 5. La plus forte contamination est observée pour les animaux provenant de Lahontan ; c'est un site très en aval au niveau du Gave de Pau. Le Phénanthrène est le HAP le plus fréquent suivi par le Pyrène. Les valeurs observées dans le foie corréleront bien avec les concentrations d'HAP mesurées au niveau du muscle. (Tableau 4).

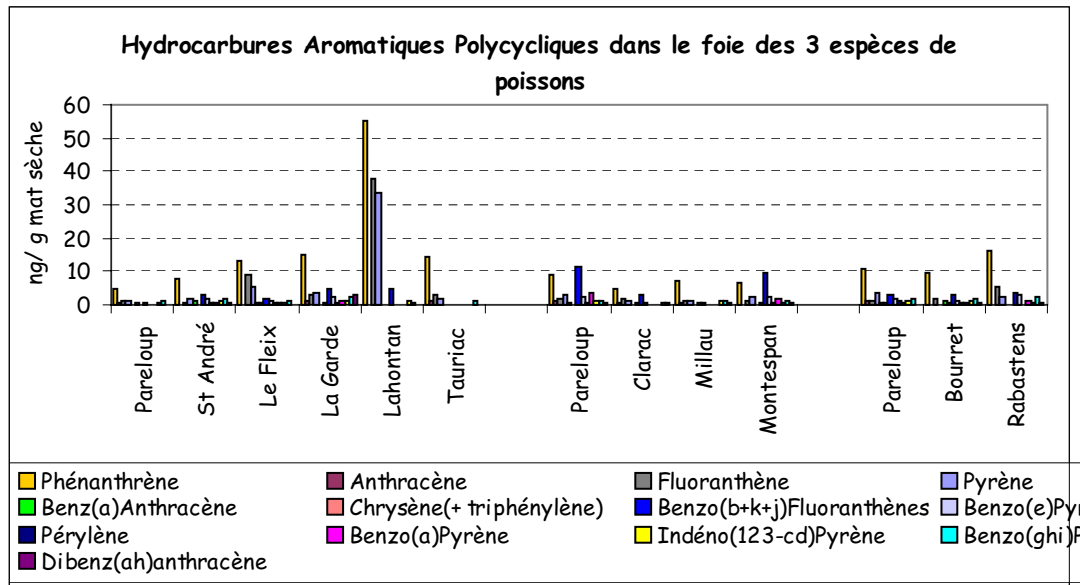


Figure 8 : Les différentes PCB mesurés dans les foies de poissons récoltés sur les différents sites de prélèvement.

c)- Au niveau de l'eau

Les tableaux des valeurs individuelles des pesticides mesurés dans l'eau des rivières (l'atrazine, la déséthylatrazine, la simazine, déséthylsimazine, le carbofuran et le carbaryl) sont reportés en [annexe 2](#). Les taux mesurés sont représentés dans la figure 9.

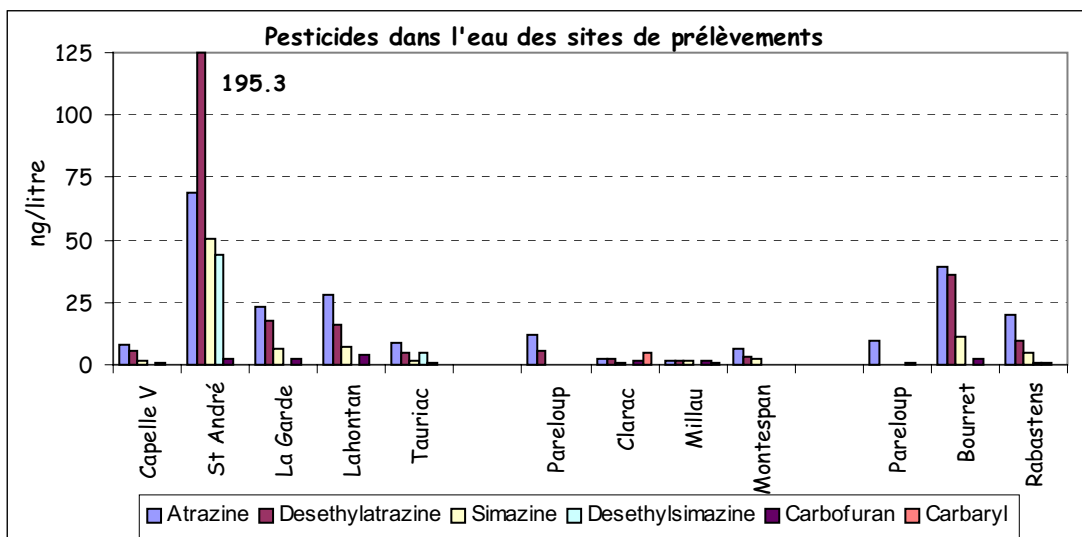


Figure 9: Taux des pesticides mesurés dans l'eau des sites de prélèvements

L'Atrazine et son dérivé la deséthylatrazine sont les pesticides les plus représentés dans les eaux des rivières analysées. Saint-André de Lidon est le site qui a le taux le plus élevé de ces pesticides (avec une quantité de deséthylatrazine 5 fois plus importante que pour le site de Bourret, et environ 20 fois supérieure à celle des autres sites).

La Simazine et son métabolite la deséthylsimazine sont présents en quantité moindre mais non négligeable et c'est toujours dans l'eau du site de Saint-André de Lidon que l'on retrouve les valeurs les plus fortes, suivi du site de Bourret.

Le Carbofuran est présent en petites quantités sur 10 sites sur 12. Quant au carbaryl, il est en quantité inférieure au seuil de détection sur 10 sites. Cependant il représente Clarac en contient 40% de la totalité des pesticides mesurés dans l'eau du site de Clarac.

Les sources de pesticides retrouvés dans les rivières sont les rejets agricoles et le taux mesuré dans l'eau dépend de la proximité des parcelles traitées par rapport à la voie d'eau. Si une bande de 10 mètres non traitée le long de la rivière a été respectée, la pollution sera minime, si le champ traité jouxte la rive, la pollution sera majeure, ce qui semble être le cas pour St-André de Lidon sur la Seudre.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

**Scoring approach based on fish biomarkers applied to French
river monitoring**

(Accepté dans *Biomarkers*)

Le but de ce travail a été d'appliquer une approche multimarqueurs en complément aux programmes de surveillance des eaux douces, dans le cadre du programme FISHBIO de l'Agence de l'eau du bassin Adour-Garonne. Trois espèces de poissons chevaîne, barbeau et truite arc-en-ciel ont été sélectionnés dans cinq rivières de Bassin du Sud Ouest de la France. Cinq biomarqueurs d'exposition ont été mesurés dans le muscle ou le cerveau pour l'acétylcholinestérase et dans le foie pour la glutathion-S-transférase (GST), la catalase (CAT), et le 7-éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD). L'application de l'approche multimarqueurs nous a permis de distingués clairement les sites les plus pollués des sites les moins pollués. La discrimination des sites est principalement par l'activité AChE et d'EROD. Selon les indices de pollution de chaque site, une carte a été établie avec des couleurs correspondants a un degré de pollution (bleu, vert, jaune, orange et rouge) du moins pollués vers le plus pollués.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17

Scoring approach based on fish biomarkers applied to French river monitoring

**Nadia AARAB, Pascal MORA, Olivier CHAMPEAU, Michèle DAUBEZE,
Philippe GARRIGUES and Jean-François NARBONNE[§].**

Laboratoire de Physico-Toxicochimie des Systèmes Naturels (LPTC),
UMR 5472 CNRS, Université Bordeaux I,
33405 Talence Cedex. France.

[§]Corresponding authors: J.F.Narbonne.
E-mail address: jf.narbonne@lptc.u-bordeaux1.fr
Tel: +33 5 40 00 24 56 ; Fax: + 33 5 40 00 87 19

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18

ABSTRACT

The aim of this work 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 south west French rivers. Five biomarkers of response were measured either in muscle or brain for acetylcholinesterase (AChE) and in liver for glutathione *S*-transferase (GST), Catalase (CAT), and 7-ethoxyresorufine *o*-deethylase (EROD).

As a result of multivariate analysis, sites were clearly discriminated mainly by EROD and AChE 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). A sorting was established by ranging the sites from lightly to highly contaminated locations.

Keywords: Exposure biomarkers, Fish, Freshwater, Scoring approach, Pollution index.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

Introduction

Thousand 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 fifties (Mussel watch in USA, French Survey Network in France RNO) based on chemical analysis. In the eighties 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. (Mc Carthy & Shugart 1990)

Biomarkers were selected among four clusters of early molecular mechanisms of action of contaminants as: phase I and phase II of drug metabolism, oxidative stress and neurotoxicity. Glutathione *S*-transferase (GST) and Catalase (CAT) activities were found to be modulated by metal or organic contaminants both under field and laboratory condition (Pellerin-Massicotte 1994, Prahash & Rao 1995, Regoli & Principato 1995). Cholinesterase activities appeared as biomarkers of exposure for some 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

1 considered, specially for river fish, commonly used as sentinel organisms for the detection of
2 environmental pollution in freshwater. In this case, the distribution of fish species along the
3 river is a major problem for sentinel species availability. Fish are collected by electric fishing,
4 minimizing the initial stress, but the mobility and movement patterns of the test organism will
5 also affect biomarker responses. The exposure levels of fishes to persistent contaminants are
6 in part related to their level in a food chain (BAFs: Bioaccumulation factors). Our aim in this
7 study is to evaluate the biomarker responses in fish collected during the FISH BIO
8 programme.

9

10 **Materials and methods**

11 *a) Animals*

12 Three omnivorous species were selected:

13 Barbel (*Barbus barbus*) is the largest cyprinide in Europe. It is a strictly riverine fish
14 (Huet 1949) living in rivers with fast flow, stony, gravelly bottom and well oxygenated water.
15 The barbel distribution extends over the major part of Western Europe (southern most
16 extension limited to the bassins of the Rhone and the Danube). Relatively sedentary apart
17 from the spawning period, the barbel can move considerably (10 km) during reproduction
18 period (Baras 1992)

19 Chub (*Leuciscus cephalus*) is widely present in all the French rivers. Except for
20 (Phillipart 1987) Scandinavia and islands in the Mediterranean Sea, the Chub inhabits the
21 whole of Europe, living in fresh as well as brackish waters, such as the Baltic Sea. Despite
22 capability for adaptation to all water types, the chub has a marked preference for flowing
23 water with a hard bed.

24 Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), are know to colonize rivers, lakes and sea.
25 This specie comes from in the West coast of the United States (Rocky Mountains) and was

1 largely introduced during the XIXth century all around Europe and specially in Western
2 Europe where trout farming is strongly developed .

3
4 *b) Sample collection and preparation*

5 The three studied fish species were collected from 11 sites located in five rivers:
6 Seudre, Dordogne, Garonne, Tarn, and Gave de Pau (map 1). These sites were selected
7 according to previous studies conducted by the Adour Garonne Water Agency. Pareloup lake
8 is considered as reference site. Fishes were sampled in late summertime. These sampling were
9 carried out by electrofishing, involving a temporary paralysis of fish. The sampled animals
10 were weighted and lengthed before being sacrificed. Animals were sorted according to the sex
11 during dissection. Sex determination was made by examination of the color and size of the
12 gonades. Liver, bile, brain and muscle were taken out systematically. Bile was collected only
13 when suitable size of the individual allowed removal. Tissues and organs were kept into dry-
14 ice for further analysis.

15 *c) Preparation of subcellular fractions*

16 All samples were homogenised at 4°C in 100 mM phosphate buffer, pH 7.4 (1/3 W/V)
17 for 1 minute using a potter Elvehjem, followed by centrifugation at 9000g for 30 min.
18 Supernatants consisting of the sub-mitochondrial fractions (S9) were collected and stored at –
19 80°C until use.

20 Bile was sampled in vials and then frozen in liquid nitrogen, as pure bile without the
21 gall bladder. For small bile volumes (<30µl), an initial dilution was made at the time of
22 sampling.

23 *d) Biochemical assays*

24 Enzymatic activities were measured with a dual-beam temperature-controlled Kontron
25 Uvikon 932 spectrofluorimeter for AChE, GST and catalase activities. EROD activities and
26 proteins concentrations were measured on a microplate-reader (BIOTEC FL600).

1 Assays were run in triplicate for each individual. AChE, EROD, GST and CAT and *in vitro*
2 activities were measured in the post-mitochondrial fraction (S9) by using as substrates
3 acetylthiolcoline (Ellman *et al.* 1961), ethoxyresorufine (Burke & Mayer 1974), 1-chloro-2-4-
4 dinetrobenzene (Habig *et al.* 1974) and oxygene peroxide (Clairborne 1985) and were used
5 as described by (Michel *et al.* 1993, Mora *et al.* 1999, Vidal *et al.* 2001)

6 Protein concentrations were determined by the method of Bradford (Bradford 1976)
7 with bovine serum albumin as a standard.

8 The measurement of PAH metabolites in fish bile were performed by direct
9 fluorescence measurement (FF/SFS), followed by analysis in high performance liquid
10 chromatography coupled with fluorescence detection (HPLC-F) (Aas *et al.* 2001, Van der
11 Oost *et al.* 1997)

12 **Statistical analyses**

13 Biomarkers data were analyzed by carrying out ANOVA and Tukey tests.
14 *Discriminant analysis* : The discriminant analyses (DA) allow separating of different sites
15 using factor or discriminating functions, as linear combinations of the original variables
16 (Narbonne *et al.* 1999). In order to select the biomarkers that have the most influence in
17 distinguishing among site responses, a discriminatory power was calculated by ranking
18 analysis as follow.

19

$$20 \quad DP_i = \sum R_1 V_1 + \frac{\sum R_2 V_2}{2} + \frac{\sum R_n V_i}{n}$$

21
22 Where, i = biomarker, n = number of root, $R_n V_i$ = rank number of the discriminatory variable
23 for biomaker i and root n.

24 Discriminatory patterns were presented using two dimensional graphs of the first two
25 roots covering the largest fraction of variance. The data in this study were analysed by using
26 the Statistica 6.0 computer software package (Statsoft Inc.)

1 *Pollution index:*

2 All the studied biomarkers were here gathering together in a global index, in order to give a
3 relative idea of the pollution level undergone by the animals.

4 Multimarker pollution index (MPI) for each site is calculated as $MPI_i = \sum_{j=1} BPI$
5

6 Where $i =$ site, $j =$ biomarker, BPI=Biomarker pollution index from the table of conversion
7 (Table 1) for individual mean (X_i), related to discriminatory factor (DF) of the measure.

$$8 \quad DF = (X_{\max} - X_{\min} + CI) / CI$$

9 Where $X_{\max} =$ Mean max, $X_{\min} =$ Mean min, CI = confidence interval given by Tukey's test.

10
11 Finally a pollution scale was established including five levels (from lightly to highly
12 contaminated). The index level was then converted into colours (red, orange, yellow, green
13 and blue from the highest to the lowest pollution effect) to map pollution levels.

14 The MPI classification scale from 1 to 5 (Narbonne *et al.*, 1999) was firstly applied in
15 European BIOMAR Programme.

16 **INSERT TABLE 1**

17
18 The global biomarker index of each site investigated was calculated and converted to a
19 pollution score level as previously described by Narbonne (Narbonne *et al.* 1999).

20
21 **Results**

22 **Acetylcholinesterase activity in muscle and brain:** For the chub, the cholinesterase
23 activity measured in muscle was significantly higher in animals from Le Fleix (75%) and
24 from Tauriac (+ 40%) compared to fish sampled in Pareloup. For barbel AChE level were
25 lower in Bourret site compared to Pareloup site. Brain AChE activity measured in chub was
26 lower in La Garde (-75%) than in Pareloup. No signification activity were observed for barbel
27 and trout (Table 2)
28

1 **EROD activity:** The three species show very different EROD activity from control
2 site. Trout shows an activity 2.5 times higher than barbel and 6.5 times higher than chub. For
3 the chub, the activities found in La Garde and Lahontan are significantly higher (+ 740% and
4 + 565% respectively) compared to Pareloup (Table 2).

5 For the barbel, the highest activities were found in individuals sampled in Bourret and
6 Rabastens. EROD activity measured in trout samples are significantly higher in Montespau
7 than in other sites (Table 2).

8 **Catalase activity:** Statistical tests show significant differences between the control
9 site of Pareloup and Saint-André de Lidon (+63%) for the chub. Barbel, sampled in
10 Rabastens, shows as well a significant difference (+75%) with the two other sites. No
11 significant differences were observed for the trout (Table 2).

12 **Glutathione S-transferase activity:** Only barbel sampled on Bourret revealed a
13 significative difference (+ 167%) compared to Pareloup site (Table 2). Interestingly, the
14 catalase activities are quite different in the three species sampled in Pareloup.

15

16

INSERT TABLE (2)

17

18

19 Analysis of fish from Lahontan demonstrated a clear presence of metabolites of
20 naphthalene and pyrene compared to Pareloup. Moreover a significative difference was
21 observed in Millau for naphthalene metabolites compared to pyrene and benzo(a)pyrene
22 metabolites (Table 3).

23

INSERT TABLE (3)

24

25

26

1 **Discriminant analysis**
2

3 Given all the biochemical parameters investigated in the present study, EROD and AChEm
4 were the best studied biomarker to differentiate between the sampled sites (Table 4). This
5 finding was particularly true with respect to results in chub and barbel. In trout, EROD and
6 GST were the best discriminant biomarkers.

7 **INSERT TABLE (4)**

8 For all analyses, the two main roots for discrimination between sites are EROD and AChE.
9 For the chub, sites can be ranged from Pareloup, Saint Andre de Lidon to La garde. For trout,
10 Montespan is clearly discriminated as highly contaminated site among the others. For barbel,
11 Pareloup is discriminated from Rabastens on the EROD basis and from Bourret on the AChE
12 in muscle basis (Figure 1).
13

14 **INSERT FIGURE (1)**

15 **Index calculation**

16 The results of multimarker measurement expressed as MPI and BPI for each site are presented
17 in figure 2. MPI is converted in five pollution levels associated to a color from blue to red.
18

19 **INSERT FIGURE (2)**

20 Pollution gradient was clearly indicated by mapping MPIs. Upstream sites (Clarac and Millau)
21 exhibited blue index, intermediate sites exhibited green index (Montespan, Rabastens Tauriac,
22 Le Fleix) and downstream sites (St André de Lidon and Lahontan) exhibited yellow or orange
23 index. Moreover La Garde and Bourret areas exhibited orange and yellow (respectively)
24 index. Index in Pareloup lake (selected as reference site) were blue for trout, barbel and Chub.
25 Main contaminants, usually mesasured by the Water Agency in the sampled sites (results not
26 shown), indicated pollution by PAHs in Lahontan (chemical industry upstream in Lacq),

1 contamination by heavy metals (specially Cd) in Tarn river (Rabastens, La Garde), high levels
2 of pesticides in Bourret and St André de Lidon. Gradient of PCB contamination was found in
3 Garonne river from Clarac to Bourret.

4

5 **Discussion**

6 a)- *Enzymes activities*

7 AChE is involved in the deactivation of acetylcholine at nerves ending, preventing continuous
8 synaptic transmission, which is vital for normal functioning of sensory and neuromuscular
9 systems. Many pesticides are effective AChE inhibitors and the inhibition of this enzyme has
10 been used to assess the nature and the extent of exposure of wildlife to agriculture and
11 forestry sprays. The effects observed in Bourret may indicate the presence of pesticides and/or
12 heavy metals (Olson & Christensen 1980) in water. Pesticides used in the vicinity of the
13 sampled sites are highly variable within the year and a better knowledge of agriculture and
14 forestry practices will be useful to support biochemical data. For Le Fleix and Tauriac a
15 higher AChE activity in muscle was found compared to Pareloup, supposed to be a less
16 polluted site (data from Water Agency not shown). Indeed, the temperature of the
17 environment may also have a significant effect on the AChE activities (Bocquene *et al.* 1990).

18 The induction of CYP1A in fish, following exposure to certain classes of organic
19 contaminants, was the basis of the use of the cytochrome P450 system as biomarker in
20 pollution monitoring (Payne 1976). Hepatic EROD activity from all fish was significantly
21 correlated ($p < 0.05$) to PCB body burden (estimated by concentration in the muscle). Number
22 of field studies have shown a significant linear relationships between EROD induction and
23 PCBs bioaccumulation in fish (Flammarion *et al.* 1998, Monod *et al.* 1988). Indeed,
24 measurement of EROD activity in fish is a well-established *in vivo* biomarker of exposure to
25 several planar halogenated/polycyclic aromatic hydrocarbons and many structurally related
26 compounds (Lam & Gray 2003). However, some EROD values appeared to be lower

1 specially in chub from Le Fleix. Such assumed inhibition of EROD has already been found
2 on the chub in the presence of heavy metals (Flammarion *et al.* 2002).
3 Correlation between EROD activities in fish and concentration of potential EROD inducers
4 have been reported (Garrigues *et al.* 1990, Narbonne *et al.* 1991) but however in certain *in*
5 *situ* conditions, inhibition of EROD activities by other contaminations has been observed
6 (Bruschweiler *et al.* 1996, Bucheli & Fent 1995, Klumpp *et al.* 2002). However, a direct
7 correlation between single contaminant and EROD activity can hardly be expected in field
8 situations because of generalized multiple contamination. Such effect may derive from the
9 influence of another natural factor that has not been taken into account in this study yet
10 (Flammarion *et al.* 2002).

11 Despite it's popularity and apparent success, the mixed-function oxidase (MFO)
12 system itself is relatively nonspecific. Many organisms possess this detoxification enzyme
13 complex which can be induced as a response to a wide variety of natural and xenobiotic
14 compounds. Thus, MFO concentration in field collected samples are often difficult to
15 interpret, especially in localities where no point sources exist (Lam & Gray 2003).

16 Exposure to environmental contaminants involves many complex processes ending by
17 oxidative stress which can be evaluated by antioxidant enzyme activity such as catalase. The
18 two responses observed in the barbel from Rabastens and the chub from Saint André de Lidon
19 are likely due to a higher presence of heavy metals than in the other sampling sites from each
20 species (results not shown).

21 Elevated GST activity, was measured in barbel found in Bourret. This site appeared to
22 be contaminated by PCBs (results not shown). Laboratory and field studies reported a strong
23 GST induction in fish and mussels exposed to PCBs commercial mixtures or pure congener
24 (Michel *et al.* 1993).

1 The major problem we could face in an *in situ* approach for continental contamination
2 detection is the large number of compounds that could reach such ecosystem and could be
3 able to interfere.

4
5 The pyrene-type bile metabolites are correlated (data not shown) to total PAHs and
6 pyrene in liver and muscle ($p < 0.01$). The particular pyrene-type bile metabolites demonstrated
7 to be relevant as exposure marker to PAHs in fish (Aas *et al.* 2001)

8
9 b)-*Discriminant analysis*

10 Discriminant analysis (DA) has already proven to be a very useful method for
11 classifying the pollution status of different sites as reported by (Adams *et al.* 1994, Adams *et*
12 *al.* 1996). DA is performed in order to maximize the inter-site variance, thus helping to
13 characterize the differences between the various sites. Recent examples of the use of DA on
14 environmental quality data concerned the characterization of different stations along French
15 rivers (Persat *et al.* 1985) in Norwegian fjord (Beyer 1996) and in Amsterdam inland water
16 sites (Van der Oost *et al.* 1997) which were based on the results of biomarker of exposure in
17 fish provided an efficient tool for the statistical to discrimination between sampling sites.
18 EROD appeared as the main discriminant biomarker in all fish species investigated. This
19 result is according to the number of biomonitoring using biomarkers in fish (Wilson *et al.*
20 2000). In the VALIMAR programme (Behrens & Segner 2001), among the biotransformation
21 index studied, only EROD activity (specially in trout) distinguished between the study sites.
22 In our study, AChE measured in muscle was also able to discriminate sites in chub and barbel,
23 while GST activity was found to be a discriminant biomarker only for trout. The results of
24 VALIMAR study indicated that GST was not a discriminant biomarker for loach and trout.

1 With the use of more than one biomarker in monitoring, traditional analysis of
2 variance (or non parametric equivalents) approaches to data interpretation are challenged to
3 characterize and group the data. The multi-biomarker approach is similar to common
4 procedures in human epidemiology where many responses are interpreted to diagnose disease
5 (Handy *et al.* 2003). With measurement of multiple responses more powerful multivariate
6 statistics may be used to investigate the data and look for grouping or trends. (Chèvre *et al.*
7 2003), for example, evaluated effects at the cellular and molecular levels in the clam *Mya*
8 *arenaria* with discrimination methods. Rough set analysis was used to classify sites and
9 identify important biomarkers for defining the groups. This type of analysis is particularly
10 useful since it is a simple and efficient method for classifying multivariable biomarker data,
11 and furthermore, it is free from distributional assumptions.

12 As suites of biomarkers are more frequently used to evaluate the effects of
13 contaminant exposure to assess environmental stress, constraints such as the availability of
14 living material may limit the collection of data and thus hinder interpretation. (Beliaeff &
15 Burgeot 2002) describe a simple method summarizing biomarker responses, thereby aiding
16 interpretation. These authors used star plots to display results for a range of biomarkers and
17 integrated response was computed as the star plot area. The integrated responses was then
18 used to investigate spatial and temporal variation in contaminant exposure. The approach was
19 applied to Baltic Sea and English Channel sites and the integrated biomarker responses
20 compared well with PAH and PCB levels measured in mussel and fish tissues (Beliaeff &
21 Burgeot 2002) The scoring approach applied to multimarker study and firstly developed for
22 marine pollution monitoring (Narbonne *et al.* 1999) seems to be a useful method for
23 classifying the pollution level of different river sites, when applied to freshwater fish species.
24 The results indicate that biological monitoring based on biomarker of exposure is an
25 appropriate method providing reliable environmental risk assessment.

1

2 **Conclusion**

3 Fish appeared to be a useful species for freshwater monitoring. However the problem of the
4 presence of different species corresponding to different biotas along the rivers appeared to be
5 limiting factors. While the specific enzymes activities may be different in the fish species
6 studied, the scoring approach which takes into account the relative responses of biomarker of
7 exposure, provides an adequate tool for comparison between areas. The pollution gradient in
8 some rivers from upstream to downstream were mapped by using color scale, thus providing
9 useful information for risk management.

10

11 **Acknowledgements**

12 The Water Agency Adour Garonne is acknowledged for financial support of FISH BIO
13 programme (2001-2002). The authors would like to thank the group Total for the
14 computerisation of the pollution index, Pascal Mora for technical assistance and Dr Daniel
15 RIBERA for his helpful information and discussion.

16

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38

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**, 213-29.
- 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.
- 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'électricité et observation directe. Doctorate Thesis, Université de Liège, Belgique.
- Behrens, A., and Segner, H.,2001, Hepatic biostransformation 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**, 1316-22.
- 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, Characterisation 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.
- Bucheli, 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.

- 1 Chèvre, N., Gagne, F., Gagnon, P., and Blaise, C.,2003, Application of rough sets analysis to
2 identify polluted aquatic sites based on a battery of biomarkers: a comparison with
3 classical methods. *Chemosphere*, **51**, 13-23.
- 4 Clairborne, A., 1985, Catalase activity in *Handbook of methods for oxygen radical research*,
5 edited by Greenwald (Boca Raton: CRC Press), pp 283-284.
- 6 Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. J., and Featherstone, R. M.,1961, A new and rapid
7 colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical*
8 *Pharmacology*, **7**, 88-95.
- 9 Flammarion, P., Migeon, B., and Garric, J.,1998, Statistical analysis of cyprinids EROD data
10 in a large French watershed. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **40**, 144-153.
- 11 Flammarion, P., Noury, P., and Garric, J.,2002, The measurement of cholinesterase activities
12 as a biomarker in chub (*Leuciscus cephalus*): the fish length should not be ignored.
13 *Environmental Pollution*, **120**, 325-330.
- 14 Garrigues, P., Raoux, C., Lemaire, P., Ribera, D., Mathieu, A., Narbonne, J. F., and Lafaurie,
15 M.,1990, *In situ* correlation between polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and
16 PAH metabolizing system activities in mussels and fish in the mediterranean sea:
17 preliminary results. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **38**,
18 379-387.
- 19 Habig, W. H., Pabst, M. J., and Jakoby, W. B.,1974, the first enzymtic step in mercapturic
20 acid formation. *journal of Biological Chemistry*, **249**, 7130-7139.
- 21 Handy, R. D., Galloway, T. S., and Depledge, M. H.,2003, A proposal for the use of
22 biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology.
23 *Ecotoxicology*, **12**, 331-343.
- 24 Huet, M.,1949, Aperçu des relations entre la pente et les populations piscicoles des eaux
25 courantes. *Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie - Swiss journal of Hydrology*, **11**,
26 29-41.
- 27 Klumpp, D. W., Humphrey, C., Huasheng, H., and Tao, F.,2002, Toxic contaminants and
28 their biological effects in coastal waters of Xiamen, China. II. Biomarkers and embryo
29 malformation rates as indicators of pollution stress in fish. *Marine Pollution Bulletin*,
30 **44**, 761-769.
- 31 Lam, P. K. S., and Gray, J. S.,2003, The use of biomarkers in environmental biomonitoring
32 programmes. *Marine Pollution Bulletin*, **47**, 182-186.
- 33 Mc Carthy, J.-F., and Shugart, L. R. 1990, *Biomarkers of environmental contamination*,
34 (Boca Raton)
- 35 Michel, X. R., Cassand, P. M., and Narbonne, J. F.,1993, Activation of benzo[a]pyrene and 2-
36 aminoanthracene to bacteria mutagens by mussel digestive gland postmitochondrial
37 fraction. *Mutation Research*, **301**, 113-119.
- 38 Michel, X. R., Suteau, P., Robertson, L. W., and Narbonne, J.-F.,1993, Effects of
39 benzo(a)pyrene, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl and 2,24,4',5,5'-hexachlorobiphenyl on

- 1 the xenobiotic-metabolizing enzymes in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*).
2 *Aquatic Toxicology*, **27**, 335-344.
- 3 Monod, G., Devaux, A., and Riviere, J. L.,1988, Effects of chemical pollution on the
4 activities of hepatic xenobiotic metabolizing enzymes in fish from the river Rhône.
5 *Science of the Total Environment*, **73**, 189-201.
- 6 Mora, P., Fournier, D., and Narbonne, J. F.,1999, Cholinesterases from the marine mussels
7 *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and *M. edulis* L. from the freshwater bivalve
8 *Corbicula fluminea* Muller. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, **122**, 353-
9 361.
- 10 Najimi, S., Bouhaimi, A., Daubeze, M., Zekhinini, A., Pellerin-Massicotte, J., Narbonne, J.-
11 F., and Moukrim, A.,1997, Use of acetylcholinesterase in *Perna viridis* and *Mytilus*
12 *galloprovincialis* as a biomarker of pollution in Agadir marine bay (South of
13 Morocco). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **58**, 901-908.
- 14 Narbonne, J.-F., Daubeze, M., Clerandau, C., and Garrigues, P.,1999, Scale of classification
15 based on biochemical markers in mussels: application to pollution monitoring in
16 European coasts. *Biomarkers*, **4**, 415-424.
- 17 Narbonne, J. F., Garrigues, P., Ribera, D., Raoux, C., Mathieu, A., Lemaire, P., Salaun, J. P.,
18 and Lafaurie, M.,1991, Mixed-function oxygenase enzymes as tools for pollution
19 monitoring: field studies on the French coast of the Mediterranean Sea. *Comparative*
20 *Biochemistry and Physiology C*, **100**, 37-42.
- 21 Olson, D. L., and Christensen, G. M.,1980, Effects of water pollutants and other chemicals on
22 fish acetylcholinesterase (*in vitro*). *Environmental Research*, **21**, 327-335.
- 23 Payne, J.,1976, Field evaluation of benzopyrene hydroxylase induction as a monitor for
24 marine petroleum pollution. *Science*, **191**, 945-946.
- 25 Pellerin-Massicotte, J.,1994, Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine
26 bivalves. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, **3**, 101-111.
- 27 Persat, H., Nelva, A., and Chessel, D.,1985, Approche par l'analyse discriminante sur les
28 variables qualitatives d'un milieu lotique: le haut Rhône français. *Acta oecologica*,
29 *oecologica generalis*, **6**, 356-381.
- 30 Phillipart, J. C.,1987, Démographie, conservation et restauration du barbeau fluviatile,*Barbus*
31 *barbus* (L.) dans la Meuse et ses affluents. Quinze années de recherches. *Annales de la*
32 *Société Royale de Zoologie, Belgique*, **117**, 49-62.
- 33 Prahash, N. T., and Rao, K. S. J.,1995, Modulations in antioxidant enzymes in different
34 tissues of marine bivalve *Perna viridis* during heavy metal exposure. *Molecular and*
35 *Cellular Biochemistry*, **146**, 107-113.
- 36 Regoli, F., and Principato, G.,1995, Glutathione, glutathione-dependant and antioxidant
37 enzymes in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metal under field and
38 laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquatic*
39 *Toxicology*, **31**, 143-164.

- 1 Van der Oost, R., Vindimian, E., Van den Brink, P. J., Satumalay, K., Heida, H., and
2 Vermeulin,1997, Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*):
3 statistical analyses of relationships between contaminant exposure and biomarkers.
4 *Aquatic Toxicology*, **39**, 45-75.
- 5 Vidal, M. L., Basseres, A., and Narbonne, J. F.,2001, Interest of a multibiomarker approach in
6 the assessment of freshwater ecosystem quality: laboratory and field studies. *Water*
7 *Science Technology*, **44**, 305-312.
- 8 Wilson, J. Y., Addison, R. F., Martens, D., Gordon, R., and Glickman, B.,2000, Cytochrome
9 P450 1A and relatd measurments in juvenile chinook salmon (*Onchorynchus mykiss*)
10 from the Fraser river. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **55**, 405-
11 413.
12
13

1

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

2

3

4

Table 1: Index given for each biomarker response according to their rank in a scale related to the discriminatory factor.

5

6

7

8

9

10

11

	Sites	AChE Activity in muscle	AChE Activity in brain	CAT Activity	EROD Activity	GST Activity
		$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg Prot}$	$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg Prot}$	$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg Prot}$	$\text{pmol}/\text{min}/\text{mg Prot}$	$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg Prot}$
Chub	Pareloup	0,119 ± 0,02	209,73 ± 37,2	1013,42 ± 254	27,43 ± 19,02	1,61 ± 0,36
	St-A Lidon	0,148 ± 0,028	214,04 ± 23,76	1602,77 ± 493,7 *	40,38 ± 14,16	1,44 ± 0,47
	Le Fleix	0,205 ± 0,04 *	199,53 ± 37,6	804,48 ± 290,8	103,78 ± 42,23	1,37 ± 0,29
	La Garde	0,15 ± 0,038	155,35 ± 9,5 *	980,50 ± 267,6	199,39 ± 145,5 *	1,77 ± 0,28
	Lahontan	0,145 ± 0,025	180,49 ± 49,4	1031,41 ± 300,9	152,66 ± 70,2 *	1,68 ± 0,58
	Tauriac	0,174 ± 0,027 *	205,22 ± 26,9	1235,41 ± 687,05	60,93 ± 39,87	1,4 ± 0,57
Barbel	Pareloup	0,174 ± 0,042	149,52 ± 25,6	355,30 ± 164,65	72,07 ± 33,88	1,12 ± 0,38
	Bourret	0,122 ± 0,026 *	159,95 ± 29,23	462,64 ± 153,6	218,5 ± 78,28 *	1,88 ± 0,64 *
	Rabastens	0,21 ± 0,039	162,62 ± 30,67	601,36 ± 294,18 *	194,64 ± 122,37 *	1,45 ± 0,67
Trout	Pareloup	0,159 ± 0,04	106,33 ± 49	575,84 ± 263	176,64 ± 144,83	1,05 ± 0,43
	Clarac	0,146 ± 0,03	77,14 ± 15,7	694,31 ± 207	161,4 ± 129,12	0,94 ± 0,33
	Millau	0,151 ± 0,04	84,96 ± 18,5	774,76 ± 276	158,73 ± 126,01	1,13 ± 0,41
	Montespan	0,128 ± 0,01	118,72 ± 67,2	794,84 ± 161,5	458,16 ± 200,57 *	1,4 ± 0,53

12

13

Table 2: Results of Biomarker measurements for each site studied during FISHBIO

14 programme. Values are means ± SD (Standard deviations, n=20). * = Significantly different

15

from reference site.

16

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

	Sites	naphthalene FF290/335	pyrene FF341/383	benzo(a)pyrene FF380/430
Chub	Pareloup	3287± 898	268±86	79±28
	St-André	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

Table 3: PAH metabolites measured in bile from fish collected in sampled sites

FF: fixed wavelength fluorescence. For naphthalene: (μg naphthalene equivalents /ml bile) for pyrene.(μg pyrene equivalents /ml bile) and for benzo(a)pyrene .(μg benzo(a)pyrene equivalents /ml bile). Values are means \pm SD (Standard deviations, n=20) * Significantly different from reference site, ($p < 0,05$)

Chub		Brabel		Trout	
Biomarkers	D P	Biomarkers	D P	Biomarkers	D P
EROD	5,7	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

Table 4 : Ranking of the biomarker measured in the present study as listed according to their discriminant power.

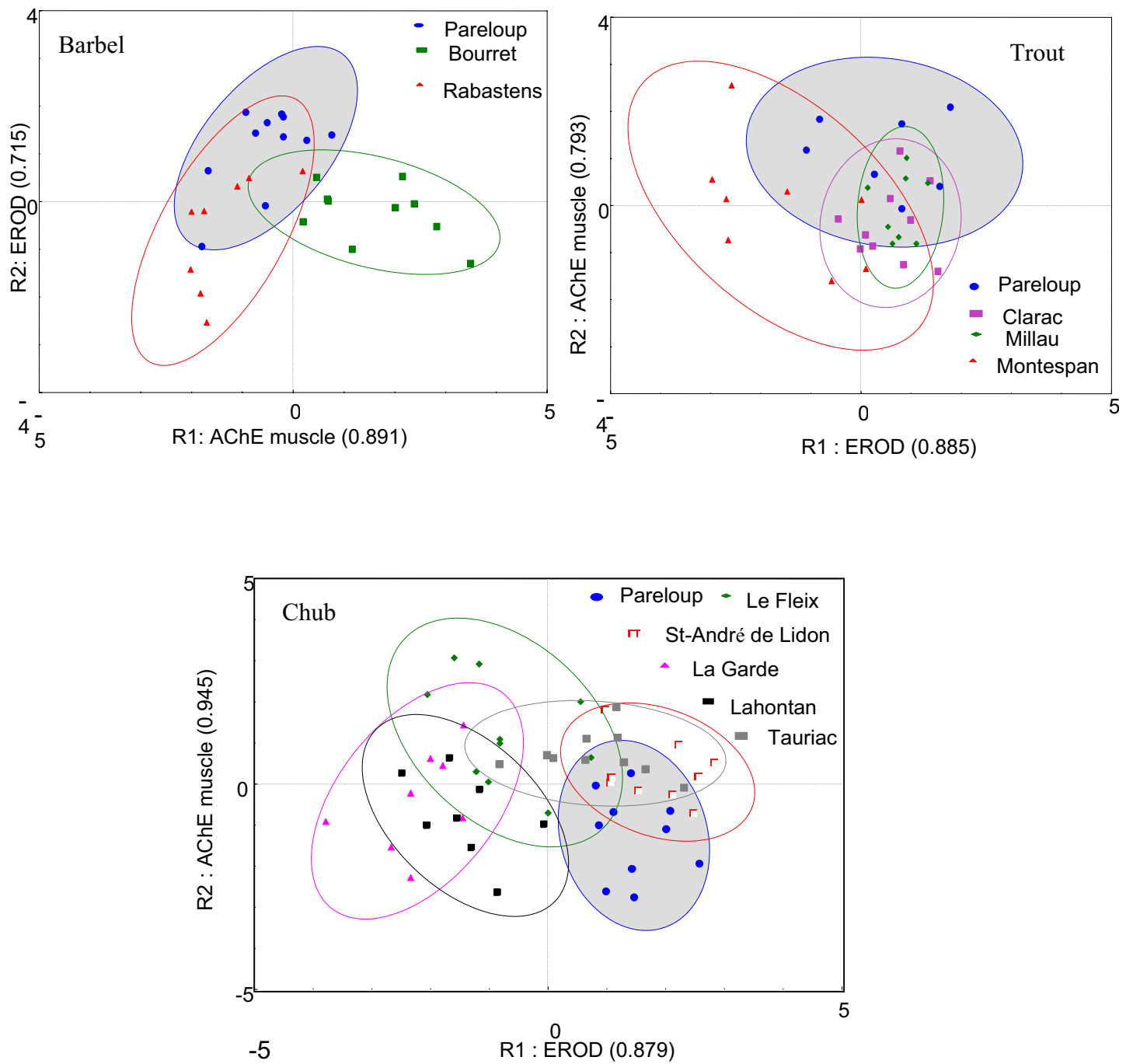
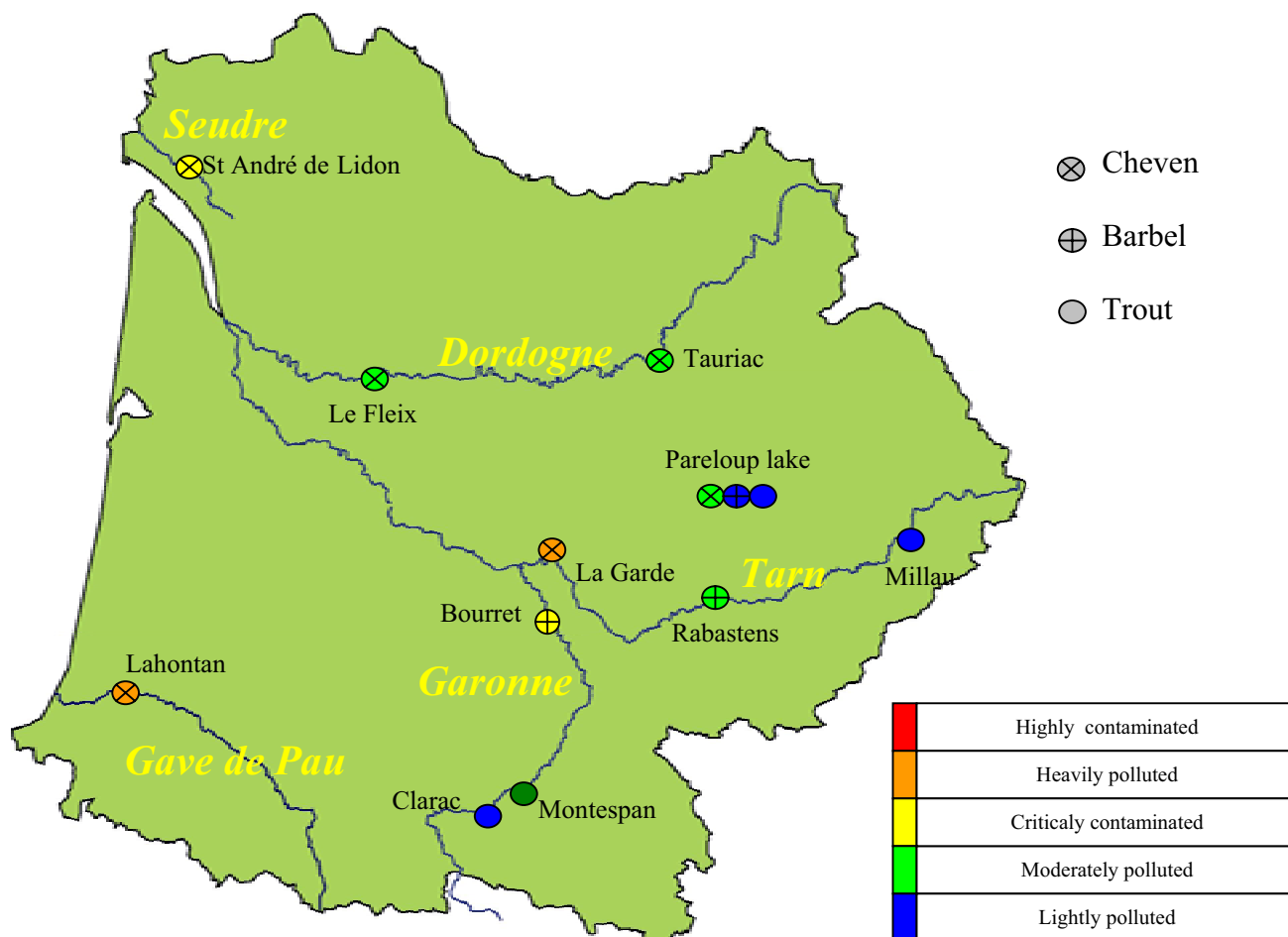


Fig 1: Discriminant analysis for barbel, trout and chub respectively sampling sites



Map1: Dordogne-Garonne bassin, South West, France

PARTIE 2 :

Les biomarqueurs d'effets : Les perturbateurs endocriniens *in vitro* et *in vivo*

1-Introduction

Depuis plusieurs années, on a observé que certaines substances chimiques peuvent perturber les systèmes endocriniens humains et animaux, ce qui implique des effets sur le développement, la croissance, la reproduction et le comportement. (European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife, 1996; Colborn *et al* 1996; Levi, 1999).

Les effets des perturbateurs endocriniens sur la reproduction des poissons ont alerté la communauté scientifique internationale et font l'objet de nombreuses recherches dans les pays industrialisés. Cette inquiétude croît face à une série de substances dénommées "perturbateurs endocriniens PE". Ces composés chimiques peuvent avoir des effets néfastes pour la santé, notamment provoquer des cancers, des modifications du comportement et des anomalies de la reproduction. Ce phénomène a beaucoup retenu l'attention des médias. Dans l'Union Européenne, de plus en plus de questions parlementaires ayant trait à l'utilisation et à la réglementation de substances susceptibles de perturber le système endocrinien ont été adressées à la Commission Européenne depuis 1997.

Dans la même année, le Parlement européen a pris l'initiative d'établir un rapport sur la question, qui a été débattu et soumis au vote lors de la session plénière d'octobre 1998. Dans sa résolution, le Parlement a demandé à la Commission de prendre des mesures spécifiques visant en particulier à améliorer le cadre législatif, à renforcer les efforts de recherche et à informer la population.

En outre, plusieurs États membres ont lancé des programmes nationaux de recherche portant sur la perturbation endocrinienne (notamment le Danemark, la Finlande et le Royaume-Uni EDMAR). D'autres États membres ont déjà instauré des mesures spécifiques pour restreindre ou interdire l'utilisation de certaines substances suspectes en raison des effets toxiques signalés à leur égard (Suède, Belgique, Royaume-Uni, Pays-Bas, Danemark).

Dans le cadre du Programme International sur la Sécurité des Substances Chimiques (PISC) auquel participent l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE) et l'Organisation Internationale du Travail (OIT), il a été convenu, en concertation avec des experts japonais, américains, canadiens, l'Organisation de Coopération et Développement

Economique (OCDE) et l'Union Européenne, des définitions suivantes pour les perturbateurs endocriniens :

*«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.»*

2-Le système endocrinien

Le système endocrinien se compose d'un ensemble de glandes comme la glande thyroïde, les ovaires, les testicules, les glandes surrénales, et des hormones qu'elles produisent, comme la thyroxine, les œstrogènes, la testostérone et l'adrénaline, qui agissent sur le développement, la croissance, la reproduction et le comportement des animaux et des êtres humains. Les hormones sont des molécules de signalisation qui circulent dans le sang et provoquent des réponses dans d'autres parties de l'organisme. Les hormones sexuelles sont de deux types : protéines ou stéroïdes. Les stéroïdes ont un poids moléculaire situé aux environs de 300 daltons; ils ont donc une petite taille. Vu leur taille et leur liposolubilité, ils peuvent diffuser librement dans les cellules cibles, par conséquent leurs récepteurs sont intracellulaires. Par opposition, les protéines, avec un poids moléculaire supérieur à 5000 daltons ne peuvent pas pénétrer dans les cellules et leurs récepteurs sont donc membranaires. Puisque les stéroïdes sont liposolubles ils ne peuvent circuler dans le sang que liés à des protéines non spécifiques comme l'albumine ou à des protéines spécifiques comme la SHBG (Sex Hormone Binding Globulin). Les hormones protéiques, en revanche, sont hydrosolubles et circulent librement dans le sang (Tableau 1).

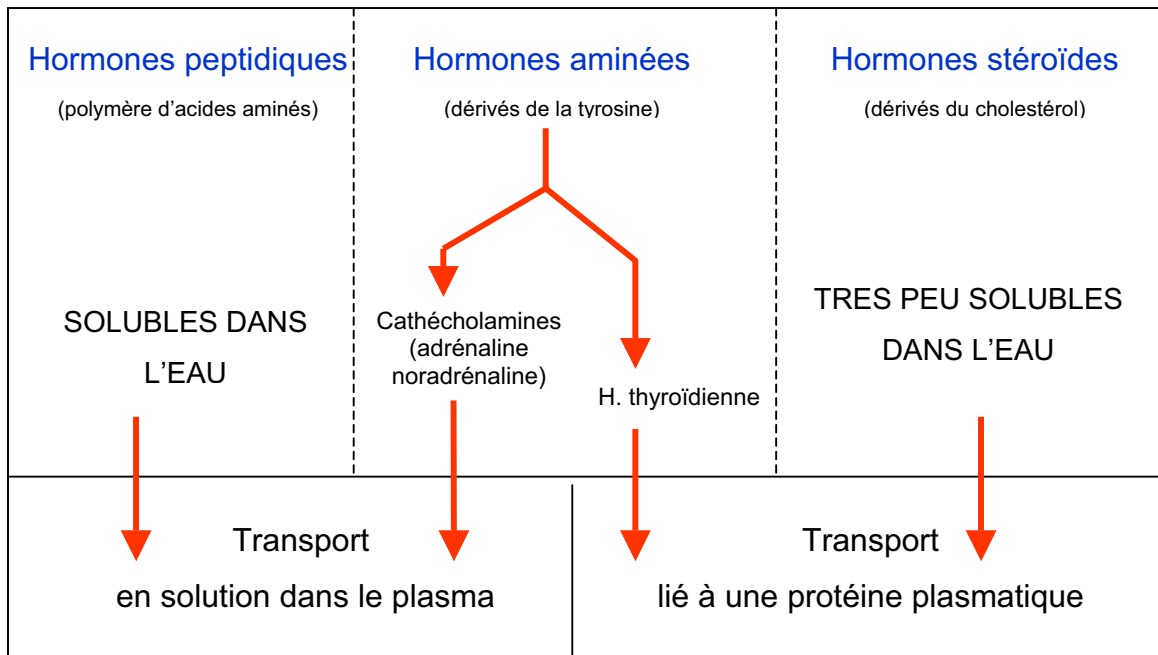


Tableau 1 : Classification chimique des hormones et mode de transport

La compréhension du rôle du système endocrinien (et des hormones produites par ces glandes) dans le fonctionnement normal de l'organisme nous donne une idée des types de problèmes qui peuvent survenir quand le système endocrinien est dérégulé. Par contre, l'interaction entre les organes étant très complexe il est extrêmement difficile de définir ou de prévoir les effets des perturbateurs.

3-Les substances susceptibles de perturber le système endocrinien

On compte deux classes de substances capables de provoquer une perturbation endocrinienne:

❖ Les *hormones naturelles*:

- - les œstrogènes : hormones femelles, produites surtout par les ovaires, responsables du développement des caractères sexuels féminins et nécessaires à la reproduction. Les glandes surrénales en produisent également une petite quantité.
- - la progestérone et la testostérone, naturellement présentes dans l'organisme des hommes et des animaux.

Composés	Aliments
Luzerne	Biochanine A, Coumestrol, Daidzéine,
Orge, riz, seigle, sésame, sorgho, blé	Zéaralénone
Pois chiche	Biochanine A
Trèfles	Biochanine A, Coumestrol Daidzéine, Formonométhine Génistéine
Soja	Coumestrol, Daidzéine génistéine
Maïs, avoine	Zéaralénone, zéaranol

a) Présence de phytoestrogènes dans notre alimentation

Composés	Aliments	Concentrations
soflavones	Soja	8g/kg (farines)
Coumestanes	Luzerne	0,5 à 10 g/kg d'aliment
Oestradiol	Lait de vache	10 à 25 pg/ml
	Lait de soja	30 à 50 µg/ml
	Lait maternel	500 pg/ml
Phyto-oestrogènes	Lait de vache	2,1 à 3,2 ng/ml
	Lait maternel	1,4 à 2,8 ng/ml

b)- Concentration en composés oestrogéniques dans les aliments

Tableau 2 : Quelques exemples de phytoestrogènes trouvés dans différents aliments

les phyto-œstrogènes sont des substances d'origine végétale qui ont un effet oestrogéniques. Elles sont nombreuses, puisque à ce jour ce sont plus de 200 plantes qui ont été reconnues comme ayant des activités oestrogéniques (Farnsworth, *et al* 1975 ; Mazur, 1998). La plupart des phyto-oestrogènes appartiennent essentiellement aux familles chimiques suivantes : les isoflavones, les flavones, les lignanes, les lactones d'acides résorciliques, les coumestanes et les stilbènes. Les activités oestrogéniques des isoflavones, coumestanes et lignanes ont été démontrées à la fois *in vivo* chez l'animal et *in vitro* sur tissus animaux et humains (Whitten & Naftolin, 1992). Les germes de luzerne et le soja, ont une activité semblable à celle des œstrogènes une fois ingérés par l'organisme (Tableau 2). Les capacités oestrogéniques de ces composés serait liées à la présence, sur ces molécules d'un noyau phénol se superposant au cycle (a) de l'œstradiol ainsi qu'à la présence de deux groupements hydroxyles en position opposée sur l'édifice moléculaire formant un angle dièdre comparable à celui des groupements hydroxyles existant sur l'œstradiol (Duax & Weeks, 1980 ; Katzenellenbogen *et al.*, 1980 ; Raynaud *et al.*, 1985) (Figure1)

❖ Les substances anthropiques (Figure 1) :

➤ Les hormones de synthèse, y compris celles qui sont identiques aux hormones naturelles, telles que les contraceptifs oraux, les traitements hormonaux de substitution, l'exemple le plus frappant étant celui du diéthylstilbestrol (DES) oestrogène synthétique administré au cours des années 40 à 70 à près de 5 millions de femmes américaines enceintes afin de prévenir les risques d'avortement. En 1971, Herbst et Scully démontrent une augmentation de la fréquence des adénocarcinomes des cellules vaginales claires causé par ce DES. En 1978, Brackbold et Berendes mettent en évidence une augmentation du nombre d'avortements, du nombre de naissances avant terme et du nombre d'enfants morts nés suite à l'administration de DES. C'est au début des années 70 que la Food and Drug Administration (FDA) a retiré l'Autorisation de Mise sur Marché (AMM) du DES. Par la suite, le suivi des enfants nés de mères traitées au DES au cours de leur grossesse met en évidence de graves anomalies du développement de l'appareil reproducteur (que ce soit chez les garçons ou les filles).

➤ Certains produits chimiques fabriqués par l'industrie ont aussi des effets sur les systèmes endocriniens de la reproduction. Le DDT, pesticide utilisé jusqu'en 1970, provoque la féminisation des embryons de mouette (Fry & Tonne, 1981). Son métabolite, le DDE, induit quant à lui, la synthèse de VTG chez le poisson mâle (Sperry & Thomas, 1999).

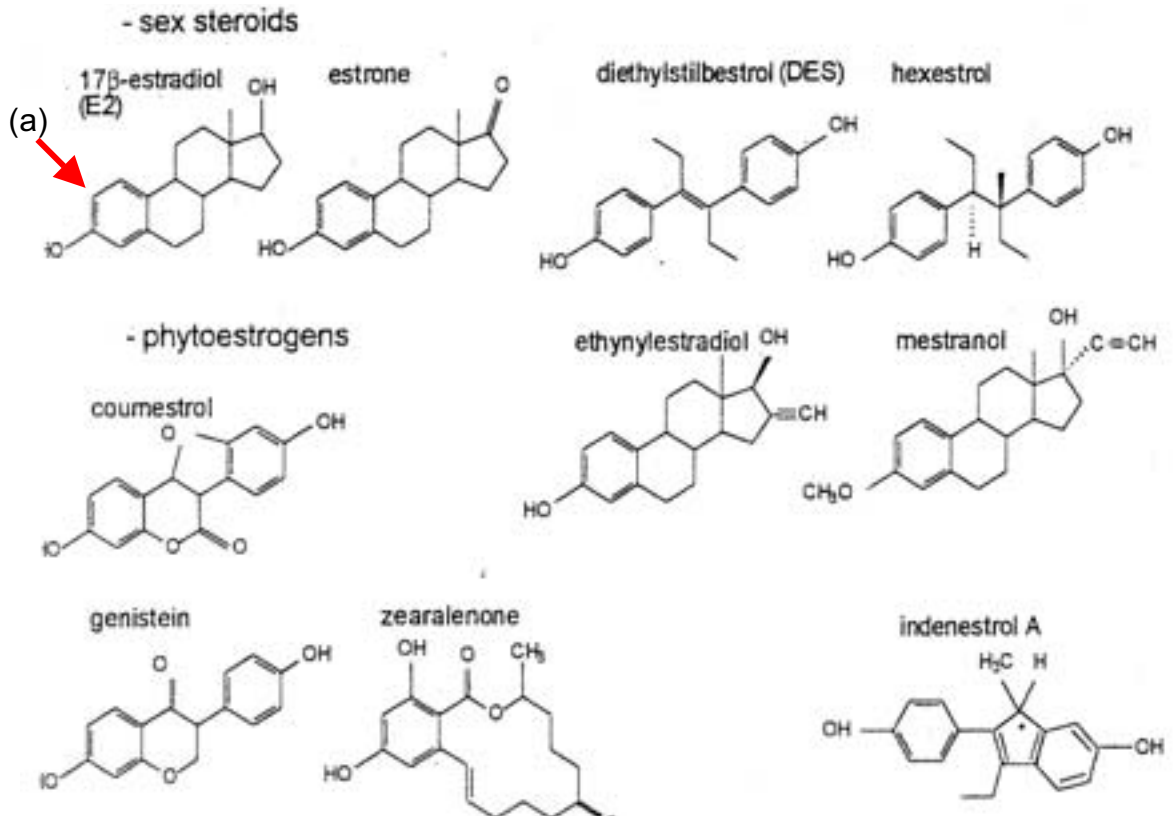
Les effets des dérivés organiques de l'étain, notamment du tributyl-étain (TBT) utilisé dans les peintures antisalissures des bateaux, sur le système reproducteur des mollusques gastéropodes constituent l'un des cas les mieux documentés d'effets tératogènes de polluants de l'environnement et de leurs conséquences sur la reproduction : « pseudohermaphrodisme » ou « imposex » (Smith, 1971 ; Gibbs & Bryan, 1986 ; Gibbs *et al.*, 1991) qui touche plus de 40 espèces de mollusques marins (Ellis & Pattisina, 1990) *Ilyanassa obsoleta* et la nasse réticulée *Hinia reticulata*, pourpre petite pierre *Nucella lapillus* (Evans *et al.*, 1991) et bigorneau indigène *Ocenebra erinacea* (Bryan *et al.*, 1986 ; Oehlmann *et al.*, 1996)

On retrouve de tels effets dans des produits utilisés en agriculture ou dans des biens de consommation, par exemple, dans certains additifs pour plastique, tel que bisphenol A, nonylphenol-poléthoxylates (Todorov *et al.*, 2002) (Soto *et al.*, 1998)

Cette catégorie comprend aussi les substances chimiques qui sont des sous-produits industriels, comme les dioxines, suspectées d'influer sur le système endocrinien de l'homme et de l'animal.

OESTROGENE NATURELS

OESTROGENE SYNTHETIQUE



PRODUITS CHIMIQUES INDUSTRIELS

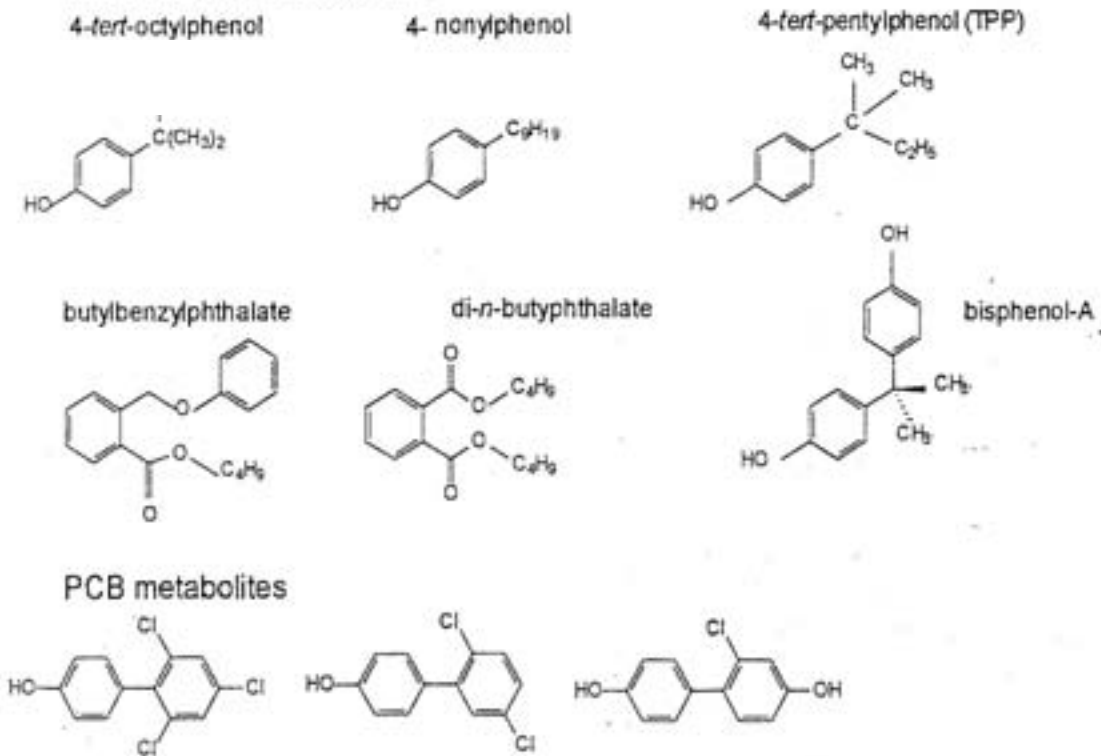


Figure 1: Structure chimique de quelques substances à effets oestrogéniques

4- Modes d'action des perturbateurs endocriniens

Les glandes endocriniennes sécrètent des hormones, qui agissent comme des «messagers chimiques». En se liant aux «récepteurs» dans les cellules, les hormones peuvent y déclencher des réactions très spécifiques et ainsi guider le développement, la croissance, la reproduction et le comportement. Les perturbateurs endocriniens interfèrent avec le rôle des hormones naturelles, notamment en se liant aux récepteurs hormonaux. Certains agents «miment» l'hormone naturelle en produisant une réaction cellulaire identique et on parle « d'Hormone mimickers » ou hormone mimétiques (agoniste) tel que le nonylphénol capable d'induire *in vivo* la synthèse de la vitellogénine (Jobling *et al.*, 1996). Certaines PCB le (104,184 et 188) se fixe efficacement sur les récepteurs aux œstrogènes chez le reptile *Anolis carolinensis*), le poisson *Onchoryncus mykiss* et chez l'homme, par contre d'autre PCB ne se fixe que de façon modérée (Matthews *et al.*, 2000).

D'autres composés «bloquent» les hormones naturelles; ils n'entraînent aucune réaction, mais empêchent l'hormone de remplir son rôle en parle d'une action anti-oestrogénique (antagoniste) (Figure 2). Dans ce cas les composés à effet anti-oestrogéniques, peuvent induire une dégradation du foie, qui, chez les femelles peut être à l'origine d'une réduction de la production de vitellogénine. Cette inhibition provoque le retard de développement des ovaires comme c'est le cas aux Etats-Unis chez limande-sole *Parophrys vetulus* (Johnson *et al.*, 1988) aussi *Pleuronectes americanus* (Pereira *et al.*, 1992).

Même sans se lier aux récepteurs, un perturbateur endocrinien peut interférer avec la synthèse, le stockage, la libération, la sécrétion, le transport, l'élimination ou l'action des hormones naturelles. Les études menées par Sivarajah *et al* (1987) sur le poisson indiquent qu'une exposition aux PCB induit une augmentation de l'activité enzymatique du foie associée à une baisse des taux plasmatiques d'hormones stéroïdiennes. La même chose à été observé chez *Coregonus clupeaformis* et *Catostomus commersoni* (Munkittrick *et al.*, 1992 ; 1994).

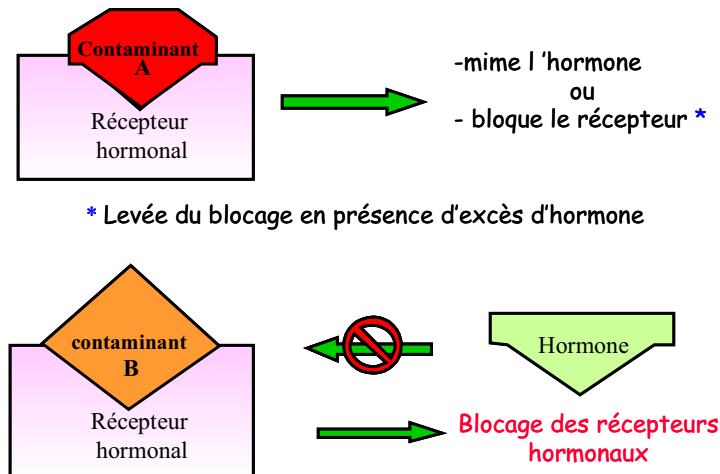


Figure 2: Action des contaminants sur les récepteurs oestrogéniques

5- Quelques effets sur les vertébrés et les invertébrés.

Les effets des perturbateurs endocriniens suscitent de nombreuses questions sur l'effet en terme de santé humaine dans la mesure où un ensemble de dysfonctionnements et de pathologies affectent notre espèce (Toppari *et al.*, 1996 ; Amaral Mendes. 2002). En effet depuis une trentaine d'année déjà, la question d'un déclin de la qualité du sperme humain a été posée (Nelson & Bunge, 1974). Le débat a été relancé en 1992 après publication du groupe danois de Skakkebaek (Carlsen *et al.*, 1992). Il s'agissait d'une méta-analyse reprenant les données de 61 publications sur la qualité du sperme durant la période 1940-1990. Selon ces auteurs, il existerait un déclin significatif du volume du sperme et de la concentration de spermatozoïdes passant de 113 millions/ml en 1940 à 60 millions/ml en 1992. Sceptiques quant aux résultats de cette méta-analyse, une étude rétrospective renforce l'hypothèse du déclin de la qualité spermatique (Auger *et al.*, 1995). Une étude menée par le Centre d'Etude et de la Conservation des Œufs et du Sperme humain (CECOS) sur des volontaires en bonne santé entre la période 1973 et 1992 a montré une baisse de 2,1% par an de la concentration de spermatozoïdes en région parisienne. Une dizaine d'autres travaux sur le sujet ont été publiés : certains ont rapporté une baisse de la qualité des spermatozoïdes produits ou de leur mobilité en Ecosse (Irvine *et al.*, 1996), en Belgique (Van Waelegheem *et al.*, 1996) et en Grèce (Adamanpoulos *et al.*, 1996) alors que dans d'autres régions ce phénomène n'a pas été retrouvé, comme c'est le cas de l'étude menée à Toulouse (Bujane *et al.*, 1996), en Finlande (Vierula *et al.*, 1996) et certaines régions des Etats Unis (Fisch *et*

al., 1996 ; Paulsen *et al.*, 1996). Bien que ces résultats soient variables selon les zones géographiques, il existe une corrélation entre ce phénomène et l'âge des individus, montrant que cela touche plus particulièrement les jeunes personnes (Lancet 1995). Certains facteurs tels que le climat, la géographie, les produits chimiques, physiques et biologiques peuvent avoir un effet sur la qualité spermatique (Sharpe *et al.* 1993, Carlsen *et al.* 1995 ; Jensen *et al.* 1995). En parallèle au déclin de la quantité et/ ou la qualité spermatique, les proportions d'anomalies du système reproducteur ont connu une hausse très importante dans la période 1970-1990 et restent à un niveau élevé (Toppari *et al.*, 1996). Les anomalies les plus fréquentes correspondent à l'hypospadias, se caractérisant par un défaut de formation de l'urètre qui ne débouche pas à l'extrémité du pénis, et au cryptorchidisme, indiquant que les testicules ne descendent pas dans le scrotum (respectivement 0,2% et 0,8% des naissances masculines). Ces pathologies relatives à la reproduction masculine s'accompagnent d'effets néfastes sur la fertilité (Swerdloff, 1985).

Outres les hommes, les femmes n'ont pas non plus été épargnées. Les effets les plus frappants sont ceux issus de l'exposition aiguë au diéthylstilbestrol (DES). Ce médicament, composé synthétique analogue aux oestrogènes a été prescrit entre 1938 et 1971 pour éviter certaines complications aux femmes enceintes (fausses couches). Cinq à dix millions de femmes ont ingéré ce médicament qui s'est malheureusement révélé être un facteur important de cancérogenèse (Herbst *et al.*, 1971). Ces femmes ont un risque accru de 30% de développer un cancer du sein, alors que les jeunes filles issues de ces mères peuvent avoir des modifications structurales de l'utérus, du vagin ou du col, présenter des problèmes de grossesse extra-utérine, accouchement prématuré et de stérilité. D'après une étude menée par Coleman *et al.*, 1993, le taux d'apparition du cancer du sein a augmenté en Europe de 5 à 25% entre 1973 et 1987. Une relation entre cette augmentation et l'exposition aux composés oestrogéniques est soupçonnée, mais aucune exposition spécifique n'a encore été identifiée.

Chez **les mammifères**, des études sur le terrain réalisées sur les phoques gris et annelés de la Baltique ainsi que par les études sur les phoques communs de la mer de Wadden, ont montré des troubles de la fonction reproductrice et de la fonction immunitaire étaient liés à la présence de PCB dans la chaîne alimentaire. Les effets sur la reproduction se sont traduits par une diminution des populations, alors que la suppression des fonctions immunitaires a probablement contribué à la mortalité massive due aux infections par le morbillivirus (Reijnders, 1986).

D'autres études (Facemir *et al.*, 1995) ont confirmé que le déclin des qualités spermatiques et l'augmentation importante de la fréquence de cryptorchidie **chez les panthères** sont dus à une contamination de l'environnement par des PCBs et autres composés organochlorés.

L'amincissement des coquilles d'œufs d'oiseaux induit par le DDE (dichlorodiphenyldichloroéthylène) est probablement le meilleur exemple de troubles de la reproduction qui sont à l'origine de très importantes diminutions des populations de plusieurs espèces de rapaces en Europe et en Amérique du Nord. D'autres effets ont également été observés, par exemple certaines anomalies dans le comportement d'accouplement des oiseaux, une grandeur anormale du nid, des gonades mal développées (testicules ou ovaires) et une mortalité accrue des embryons. L'exposition au complexe du DDE durant le développement des mâles goélands de l'Ouest a été très clairement associée à l'apparition d'un hermaphrodisme chez ces oiseaux (Peakall & Fox, 1987; Colborn, 1991)..

Chez les **alligators**, Woodward *et al.* (1993) et Guillette *et al.* (1994) ont montré que les anomalies du développement et du fonctionnement de l'organe sexuel (diminution de 90% des alligators juvéniles, apparition d'alligators démasculinisés et déféminisés) ont été associées à un déversement massif de pesticides tel que DDT(dichlorodiphenyltrichloroéthane), DDE, dans le lac d'Apopka en Floride aux États-Unis. Les effets œstrogènes/anti-androgènes observés chez ce reptile ont été imputés au complexe DDE dans des études expérimentales réalisées sur des œufs d'alligators.

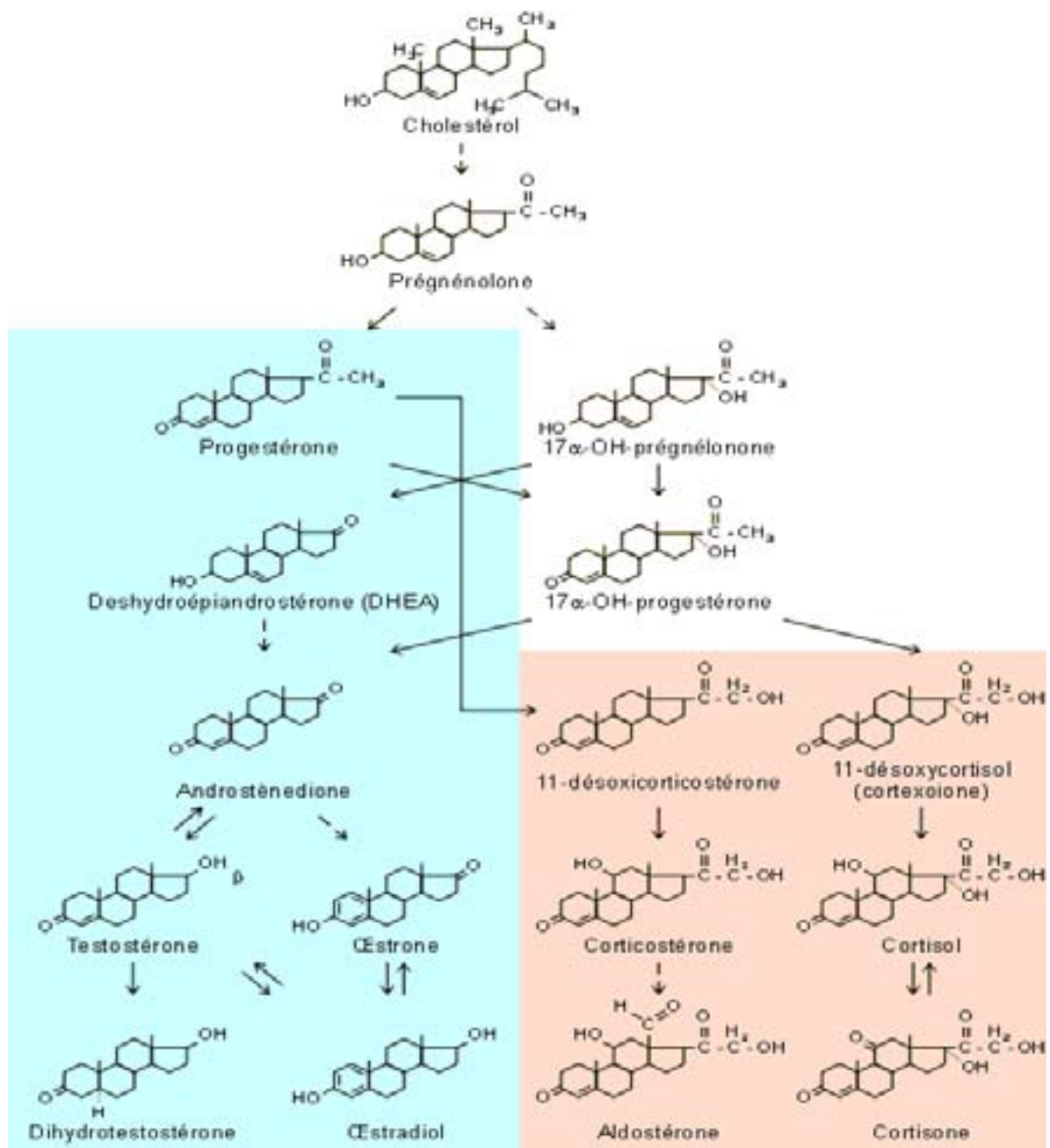


Figure 3 : Schéma de synthèse des hormones stéroïdiennes à partir du cholestérol. Le cholestérol est le précurseur commun de plusieurs molécules dont l'œstradiol. Le cadre bleu est la synthèse des hormones stéroïdiennes. Le cadre rose correspond aux hormones surrénaliennes.

La masculinisation des mollusques marins femelles ("imposex") due au tributylétain, agent biocide utilisé dans les peintures antisalissures, est probablement le cas le plus patent de perturbation endocrinienne provoquée par une substance chimique présente dans l'environnement. Le bigorneau perceur (*Nucella capullis*) est particulièrement sensible et le développement d'un pénis chez les individus femelles (imposex) a été responsable du déclin ou de l'extinction de populations locales dans le monde entier, y compris dans toutes les régions d'Europe et au large de la mer du Nord (Bryan *et al.*, 1986). Un suivi des femelles du négastéropode *Nucella lapillus* a montré une masculinisation ou l'apparition d'un pseudopénis face à des faibles concentrations (1ng/L) sous l'effet du TBT (Gibbs & Bryan, 1986).

6- Le système endocrinien chez les poissons

On retrouve chez les poissons presque toutes les glandes endocrines des mammifères. Toutefois, leur disposition anatomique diffère parfois: les homologues fonctionnels des capsules rénales, ou glandes médullosurrénales, des mammifères sont disposés différemment, avec les corps suprarénaux et interrénaux; les principaux stéroïdes surrénaliens sont le cortisol chez les poissons osseux qui ont la particularité d'avoir également des stéroïdes sexuels, notamment la 11-cétotestostérone et la 17- α -20- β -hydroxyprogestérone, et la 1- α -hydroxycorticostérone chez les sélaciens

Les îlots de Langerhans, producteurs d'insuline, ne sont pas réunis dans un pancréas individualisé, mais dans un pancréas diffus; la fonction parathyroïdienne, régulatrice de la calcémie par production de calcitonine, est assurée par le corps ultimobranchial, situé en arrière des branchies. En revanche, la localisation d'autres glandes, comme l'hypophyse, est comparable à celle des vertébrés; située sous le cerveau, l'hypophyse produit à la fois une hormone de croissance et différentes substances régulatrices (des facteurs de libération) de l'activité d'autres glandes endocrines.

La glande thyroïde est, chez les sélaciens, une petite masse individualisée et localisée en arrière de la bouche, alors qu'elle est constituée, chez la plupart des téléostéens, de vésicules dispersées autour de l'aorte ventrale. Sa physiologie a été particulièrement étudiée chez les poissons migrateurs comme le saumon ou

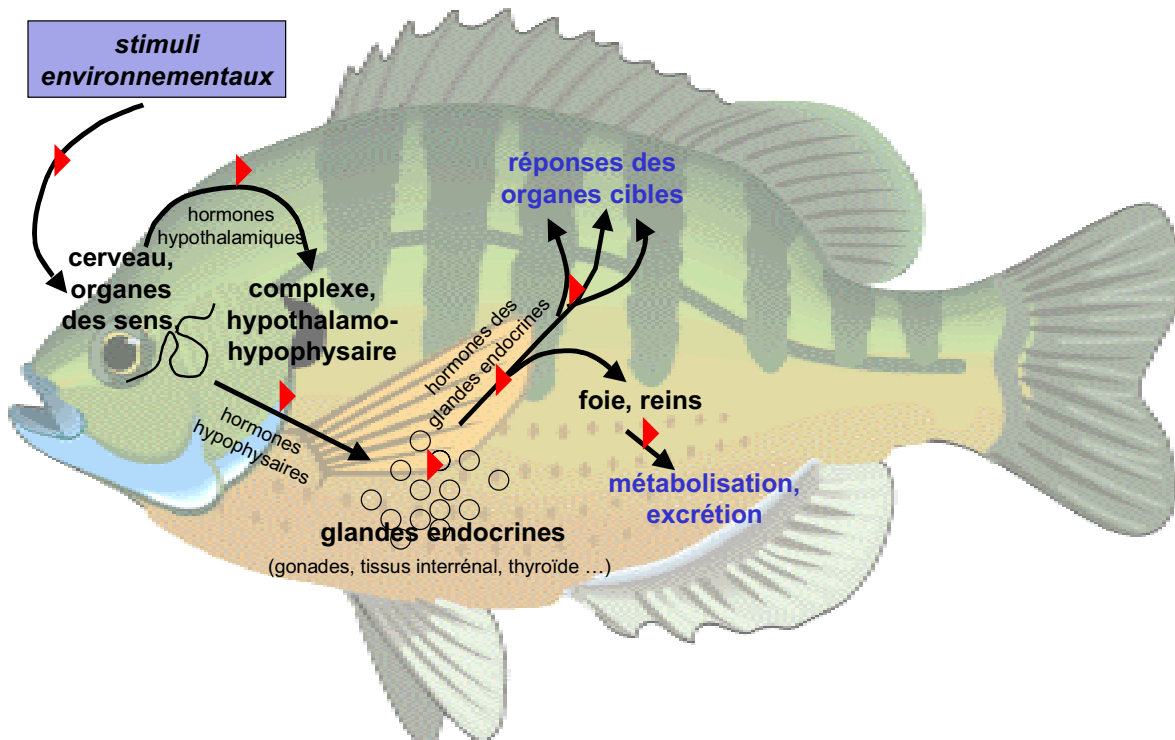


Figure 4 : Principaux sites d'actions des contaminants sur le système endocrinien des poissons. D'amont en aval : sur la perception des stimuli environnementaux, sur la synthèse et la décharge des hormones hypothalamiques, sur la synthèse et la décharge de hormones hypophysaires, sur la réponse de glandes endocrines contrôlées par l'hypophyse, sur la synthèse et la décharge des hormones par les glandes endocrines, et enfin sur le devenir de ces hormones soit au niveau de leur action sur les organes cibles soit au niveau des mécanismes permettant leur élimination. (d'après Hontela, 1998).

l'anguille dont les grandes périodes de migration correspondent à son maximum d'activité.

Les variations nycthémérales, saisonnières et annuelles de facteurs tels que la température, la photopériode ou la disponibilité de la nourriture, impliquent une synchronisation et un ajustement fin des fonctions physiologiques vitales. Le système endocrinien comme on la déjà signalé joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité physiologique en permettant, au moyen de ses effecteurs hormonaux, la régulation des efforts homéostatiques effectués par l'organisme en réaction avec les fluctuations des facteurs environnementaux (Hontela & Stacey, 1990 ; Rankin & Jensen, 1993). La sensibilité de la réponse hormonale, réponse qui précède généralement l'expression de pathologies dans les tissus et les organes ou la mortalité (Hontela *et al.*, 1993), est une caractéristique essentielle des marqueurs aptes à détecter des réponses précoces indicatrices de dommages induits par des xénobiotiques. Le polluant peut altérer la fonction endocrinienne du poisson en agissant sur le processus de synthèse et de libération des hormones au niveau de l'hypothalamus, qui constitue le lien anatomique et fonctionnel avec le système nerveux, de même qu'au niveau de l'hypophyses et des glandes cibles, aussi bien celle qui dépendent des hormones trophiques hypophysaires que les autres (Figure 4) (Hontela *et al.*, 1998). Par son action toxique sur le rein ou le foie, un polluant peut aussi altérer l'équilibre hormonal en modifiant le métabolisme des hormones, leur demi-vie dans le sang, leurs activités et leur vitesse d'élimination. Des études ont rapporté des anomalies au niveau de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadal chez des poissons exposés aux polluants. Une exposition des téléostéens au cadmium provoque une diminution de la synthèse des hormones stéroïdes et/la capacité de produire des gamètes viables (Sangalang & Freeman, 1974 ; Das, 1988), au malathion et à l'hexachlorocyclohexane (Singh & Singh, 1987), au cyanure (Ruby *et al.*, 1987 ou aux PCB (Chen *et al.*, 1986).

a)- Quelques effets sur les poissons

Chez **les poissons** vivant à proximité de certaines sources de contamination (par exemple, effluents de stations d'épuration) et dans les zones les plus contaminées, l'exposition à des déversements d'effluents industriels ou urbains entraîne des effets sur les organes reproducteurs, qui pourraient avoir des conséquences pour les populations (Desbrow *et al.*, 1998). Cependant, des inductions de la synthèse de

vitellogénine ont été observées plus fréquemment chez le gardons (*Rutilus rutilus*), dans les régions côtières du Royaume-Uni (Jobling *et al.*, 1998), le flet *Platichthys flesus* (Allen *et al.*, 1999), le plie rouge *Pleuronectes amirecanus* au Etats Unis (Pereira *et al.*, 1992), où des effets œstrogènes ont été mis en évidence dans les eaux douces, et les estuaires. Ces perturbations ne se limitent pas seulement à l'induction de la vitellogénine, mais également au développement anormal des gonades, qui se présentent soit par un retard à la maturité sexuelle, observé au Canada chez le choquemort *Fundulus heteroclitus* (Leblanc *et al.*, 1997), gobie buhotte (*Pomatoschistus minutus*) en Suède (Sandstôm., 1997), soit par l'apparition d'**intersex** qui se traduit par la présence de gonade présentant à la fois des cellules mâles et femelles, appelées ovotestis. C'est le cas d'une importante proportion des gardons mâles (100%) échantillonnés dans les rivières anglaise (Jobling *et al.*, 1998) et française (4%) (Minier *et al.*, 2000). La même pathologie a été observé en mer chez le flet (Matthiessen *et al.*, 1998). Les femelles n'ont pas été épargnées, plusieurs études signalent la présence de pathologies comme la réduction de la taille des œufs *Fundulus heteroclitus* et perturbation du cycle ovarien *Pleuronectes platessa*, (Stott *et al.*, 1983).

7- Méthodes d'évaluation

Les méthodes d'études les plus pratiquées sont rassemblées dans un rapport édité par l'OCDE dont une grande quantité de méthodes *in vivo* sur les mammifères sur lesquels peuvent être examinés de très nombreux paramètres permettant d'évaluer la fonction reproductive des adultes (poids des gonades et histopathologie, dosage sanguin des hormones sexuelles, spermatogenèse, durée de gestation, avortements, fécondité, capacité de lactation) mais aussi les effets sur des portées obtenues après exposition des parents à des polluants (sex-ratio, poids foetal, malformations, maturation sexuelle,...). Des essais sont aussi pratiqués sur des poissons où l'on mesure la production de vitellogénine ou l'inversion de sexe chez les males (Gimono. *In vitro* les méthodes utilisent des lignées cellulaires de cancer du sein humain MCF-7) (Taylor *et al.*, 1984; Kurebayashi *et al.*, 1987; Shafie *et al.*, 1979 ; Welshons & Jordan, 1987; Soto *et al.*, 1997), des cellules d'utérus, d'ovaires,... mais aussi une méthode sur levure clonée avec les récepteurs oestrogènes ou androgène humains.

Toutes ces méthodes sont plus ou moins fiables, complexes coûteuses et, même si l'OCDE (1997) donne des recommandations et si les spécialistes s'accordent pour dire que seules les méthodes *in vivo* sont, pour le moment celles qui donnent la réponse la plus fiable, il n'existe pas encore de méthodes analytiques standardisées. Des comparaisons, effectuées par Andersen *et al.* 1999 entre plusieurs méthodes *in vitro* montrent qu'il est encore nécessaire de procéder à des essais inter laboratoires avant de disposer de méthodes validées.

Les paramètres mesurables qui permettent de détecter d'éventuels effets au niveau de la reproduction sont nombreux, parmi ceux observables chez les poissons nous trouverons (Mc Master, 2000) :

- Age de la puberté d'acquisition de la 1^{ère} maturation
- Durée de la période de reproduction
- Taux d'hormone circulante (hormone stéroïdienne, vitellogénine, gonadotropine)
- Histopathologie des gonades
- Protéines porteuses de stéroïdes (Sex stéroïde binding globulines)
- Affinité et capacité des récepteurs oestrogéniques hépatiques et des récepteurs androgénique gonadiques activité de phase I liée au métabolisme hormonal
- Stress oxydatif hépatique et gonadique.

Dans cette partie, les résultats sont présentés en trois chapitres. Le premier chapitre présentera l'étude des cultures d'hépatocytes de truite arc-en ciel. Cette étude a permis de mettre en évidence le potentiel oestrogénique de quelques contaminants sur les poissons *in vitro*. Le second chapitre de cette partie traitera une étude réalisée en aquarium sur un vertébré (le turbot) et un invertébré (la moule). Le troisième chapitre exposera l'étude *in vitro* de la métabolisation de la testostérone chez les organismes aquatiques.

CHAPITRE I : ETUDE *IN VITRO*

Synthèse de la vitellogénine par des cultures d'hépatocytes de truite arc-en-ciel *in vitro* :évaluation des effets oestrogéniques de quelques contaminants

La Vitellogénine (VTG) est une glycolipophosphoprotéine liant le calcium synthétisée par l'ensemble des vertébrés ovipares femelles au cours du cycle de reproduction. Elle est produite sous control hormonal (oestradiol) au niveau du foie, secrétée dans la circulation sanguine et transportée jusqu'aux ovaires ou elle s'accumule dans les ovocytes en croissance (vitellogénèse) par une liaison à des récepteurs spécifiques associés aux vésicules d'endocytose (Le Menn & Burzawa-Gerard, 1985 ; Rodriguez *et al.*, 1996 ; Davail *et al* 1998 ; Prat *et al.*,1998 ; Perazzolo *et al* 1999. Cette protéine est le précurseur des réserves vitellines de l'oeuf nécessaire au développement du futur embryon.

La production de cette protéine est sous dépendance des œstrogènes endogènes, produits par les femelles seulement durant le cycle de reproduction. Chez les immatures et chez les mâles, le gène codant pour cette protéine ne s'exprime pas ou peu. En revanche, il peut s'exprimer et induire la synthèse de la VTG après une exposition de ces organismes à l'œstradiol ou des contaminants appelés **Xénoestrogènes** présents dans le milieu aquatique. Ainsi, la présence de cette protéine chez les mâles et les juvéniles est considérée comme révélatrice d'une exposition des poissons aux xénoestrogènes ou dans l'alimentation et fait de la VTG l'un des biomarqueurs reconnus chez les vertébrés aquatiques (Sumpter & Jobling, 1995 ; Tyler *et al* 1996).

1-Cultures d' hépatocytes

Le foie est le principal organe impliqué dans la métabolisation des xénobiotiques. Certains composés sont transformés en métabolites pharmacologiquement actifs ou en métabolites toxiques par les hépatocytes. Le foie se caractérise par son hétérogénéité cellulaire et par la multiplicité de ses fonctions, la plupart de celles si étant assurées par les hépatocytes qui ne représentent pourtant que les deux tiers environ de la population cellulaire totale de cet organe. Il n'est pas surprenant que très tôt des modèles expérimentaux plus simples que le foie *in vivo* aient été envisagés. Les systèmes utilisés ont été longtemps le foie isolé perfusé, les tranches d'organe et les fractions subcellulaires, qui tous présentent un certain nombre de limites ; la plus notable est leur durée de vie courte, qui n'excède pas quelques heures. Ces dernières années, une place de plus en plus grande a été réservée aux études *in vitro* de longue durée ne pourrait être envisagée qu'à partir de cultures

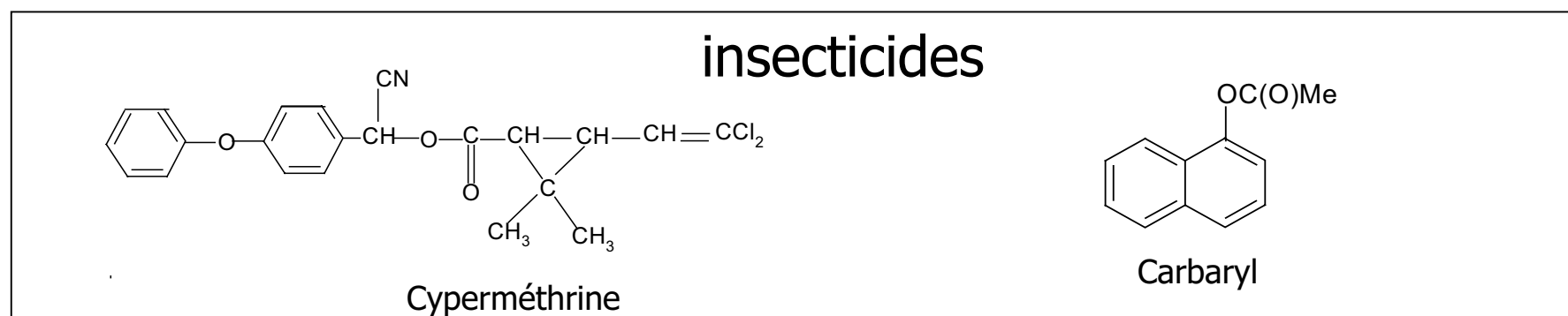
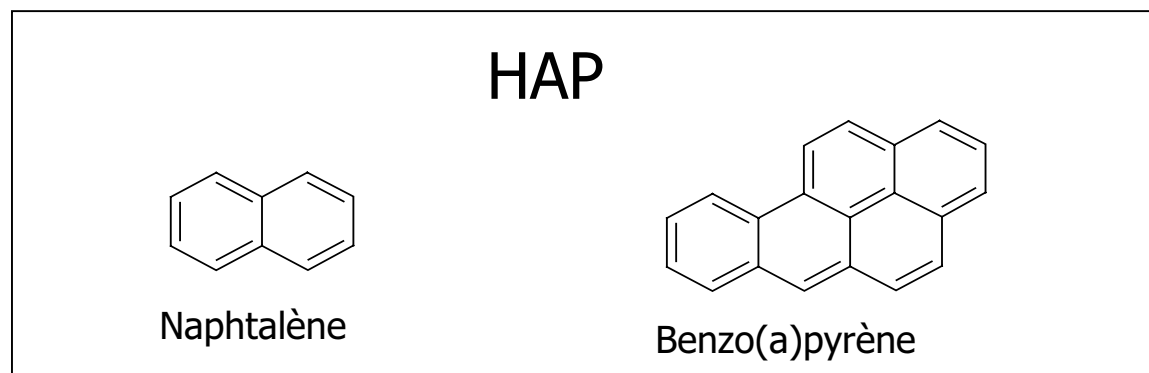
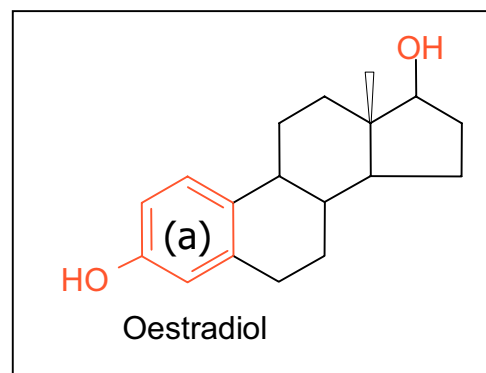
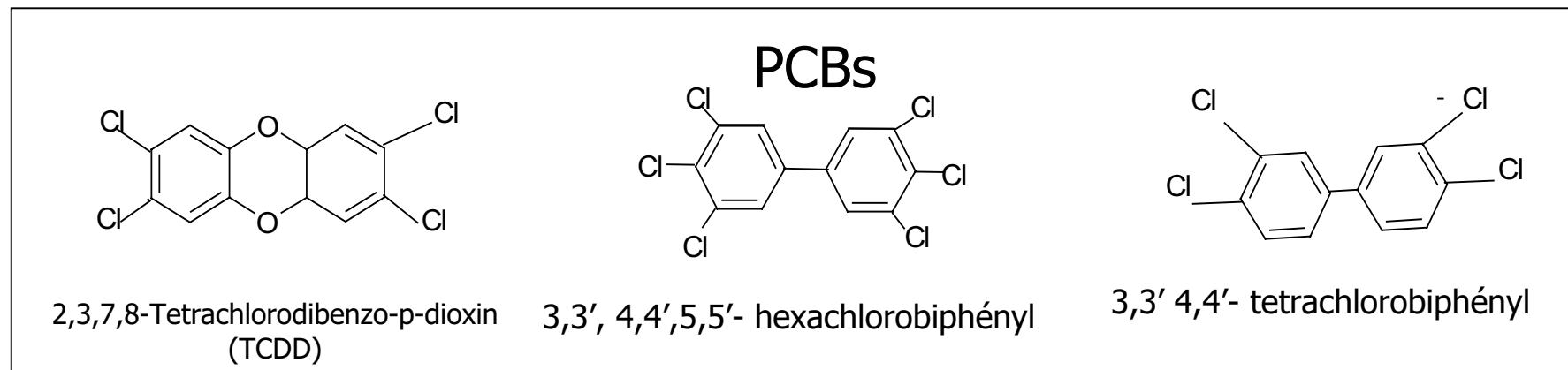


Figure 1: Structure chimique des contaminants testés

cellulaires. Encore fallait-il que l'hépatocyte conservât ses fonctions différenciées. Les hépatocytes fraîchement isolés ou en culture constituent aujourd'hui des modèles de choix pour étudier la biologie et la pathologie du foie. L'utilisation de ces modèles peut être étendue à la biologie moléculaire et à l'étude de gènes spécifiques, et leurs applications les plus significatives concernant la pharmacologie, la toxicologie, la cancérologie et la parasitologie,... Le modèle utilisé dans notre étude est la culture primaire d'hépatocytes de truite-arc-en ciel.

Comme les autres vertébrés, les poissons ovipares femelles synthétisent la vitellogénine (VTG) au niveau du foie. On retrouve aussi de la VTG dans le foie des mâles, mais en faible quantité. Plusieurs études au cours desquelles on a injecté du 17- β -oestradiol à des poissons mâles (Le Menn, 1979; Idler & Campbell, 1980; Carnevali et al.,1992) ont montré qu'ils avaient la possibilité de synthétiser cette protéine à la suite d'une induction. Cette synthèse a été expliquée par le fait que le récepteur hépatique de l'oestradiol qui contrôle la production des protéines oestrogéno-dépendantes est inductible chez les deux sexes. Ceci permet de déduire que les individus mâles ont tous les équipements moléculaires, protéiques et enzymatiques au niveau du foie leur permettant cette synthèse. L'éventail des substances qui perturbent le système de reproduction est large et varié et comprend des substances naturelles ou synthétiques. Des perturbateurs du système endocrinien présents dans l'environnement peuvent avoir des conséquences même à de très faibles concentrations. La culture des hépatocytes apparaît alors comme excellent test pour connaître le potentiel oestrogénique d'une substance ainsi que la dose à partir de laquelle on peut provoquer une induction de la VTG (Flouriot *et al*, 1998 ; Pelissero *et al.* ; 1991)

Ce test *in vitro* facilite le classement des contaminants chimiques selon leurs action par rapport à l'hormone naturelle. Soit ils modifient l'effet en l'augmentant (agoniste) soit en l'inhibant (antagoniste) et permet aussi de réaliser des tests sur une lignée cellulaire plutôt que sur l'animal (Moon *et al.*, 1995; Mugiya & Tanahashi, 1998; Amacher *et al.*, 1998; Andersson *et al.*, 1999).

2-Substances testées :

Les contaminants retenus pour cette étude sont les suivants (Figure 1) :

Les polychlorobiphényles (PCB) : L'Environmental Protection Agency (EPA) qualifie les PCBs comme un « probable cancérigène, incluent également dans les effets sur la santé: tel que, le cancer, les troubles de la reproduction, du développement et des déficiences immunitaires. C'est pourquoi ils sont classés comme perturbateurs endocriniens.

Les PCBs choisis pour notre étude sont :

Le DP6 est un produit industriel constitué d'un mélange de divers congénères synthétisés par la société PRODELEC (France). Il contient en moyenne 6 atomes de chlore, ce qui lui donne une grande stabilité dans l'environnement (Peakall & Lincer., 1970).

Le PCB77 : est un composé qui par sa structure (coplanaire), présente des propriétés toxiques. Les questions posées par ce congénère dans les organismes concernent essentiellement son effet.

Le PCB135 l'un des PCB (non coplanaire) les plus persistants dans l'environnement, il est, de plus majoritairement présent dans les estuaires français estuaires de la seine (Rapport SEINE Aval., 2002).

- Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) :

Le Benz(a)pyrène est un des HAP choisi en raison de ses propriétés mutagènes et carcinogènes d'une part et de sa présence dans l'environnement d'autre part. Ce composé présente un intérêt particulier et est souvent utilisé comme indicateur de l'exposition humaine aux HAP.

Le naphthalène est l'un des HAP trouvés dans l'environnement son métabolite naphthols constituerait un marqueur très sensible a des très faibles niveaux d'exposition aux HAP à naphthalène prédominant. Caractérisé pas son faible poids moléculaire.

- Les pesticides : La cypermethrine et le carbaryl sont les pesticides retenus pour notre étude vu leur présence dans le milieu naturel ainsi que leur structure chimique qui peu leur permettent d'être parmi la liste des substances suspecté avoir un effet perturbateur.

Il a été démontré que le carbaryl a des effets sur la reproduction des mammifères et le développement prénatal (WHO, 1992) il est classé dans la liste des inducteurs du CYP1A1, non-ligands de récepteur Ah (Aryl hydrocarbon) AhR (Sandoz *et al.*, 1999)

3-Méthode (Voir Figure 2)

L'ensemble du matériel utilisé est stérilisé au préalable au four ou à l'autoclave. Les solutions auxquelles on a rajouté de la gentamycine et une solution antibiotique-antimycotique (Pénicilline, streptomycine et amphotéricine) sont passées sur filtres à 0,2µm.

a)-Préparation du foie

Les foies sont prélevés sur des truites femelles en début de vitellogenèse provenant d'une pisciculture (Le moulin de la Cassadotte, Biganos, France). Dès leur arrivée au laboratoire, les poissons sont essuyés à l'aide d'un papier imbibé d'éthanol afin d'éviter toute source de contamination. Assommé d'un coup sur la tête, il est immédiatement placé sous la hotte à flux laminaire et ouvert ventralement.

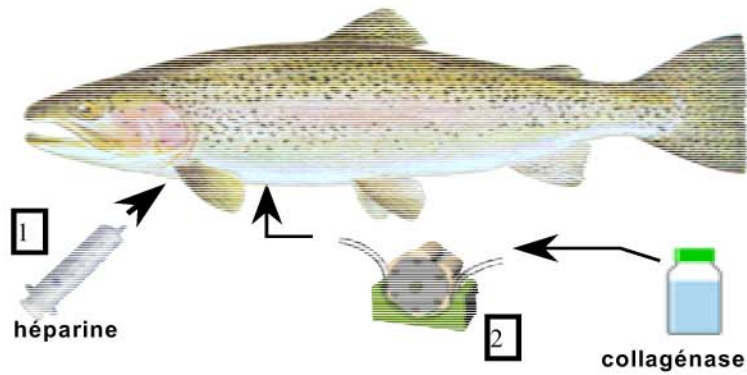
De l'héparine est injectée directement dans le cœur (de l'ordre de 2500 U) pour éviter la coagulation du sang, puis un cathéter est implanté dans la veine intestinale. Une perfusion de 20 minutes avec une première solution (voir annexe) sert à éliminer le sang et rincé ainsi le foie, une seconde solution injectée pendant 40 minutes contenant de la collagénase sert à dissocier les hépatocytes. Le cœur est déconnecté (incision aux ciseaux) pour empêcher l'augmentation de la pression dans le système circulatoire.

b)-Préparation des hépatocytes

Une fois la perfusion finie, les cellules sont bien séparées. Le foie est déposé dans une boîte de Petri contenant 20 ml de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium). La vésicule biliaire est éliminée sans l'éclater pour ne pas déverser ces acides. Le foie est légèrement dissocié dans le milieu à l'aide d'une pince. La suspension cellulaire obtenue est filtrée sur gaze stérile, puis rincée plusieurs fois avec du DMEM. La suspension obtenue est distribuée dans des tubes stériles de 50 ml afin d'être centrifugée à 30g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans le milieu de culture. Trois centrifugations sont effectuées jusqu'à ce que le surnageant devienne limpide.

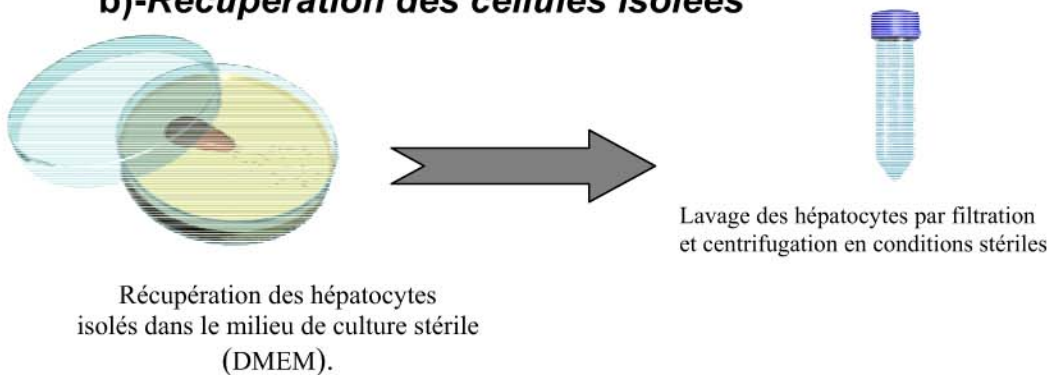
Le comptage des cellules s'effectue avec du Bleu Trypan sur cellule de Thomas. Une suspension cellulaire de l'ordre de $2 \cdot 10^6$ unités/ml est préparée par dilution. Les cellules (3 ml/puits) sont mises en culture dans des plaques stériles (TPP prolab) à six puits de 3 cm de diamètre. Les plaques, une fois fermées sont placées sur un agitateur orbital dans un incubateur à 17°C de manière à créer un courant centripète

a)-Préparation du foie de truite

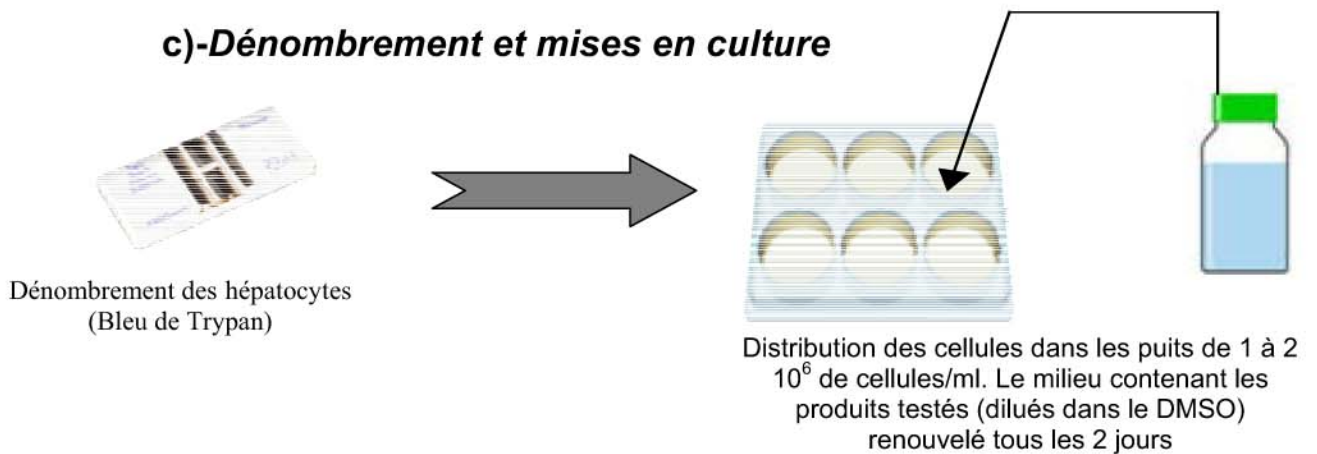


Perfusion du foie avec une solution de collagénase après injection intracardiaque d'héparine

b)-Récupération des cellules isolées



c)-Dénombrement et mises en culture



d)-Dosage de la VTG excrétée dans le milieu de culture par ELISA

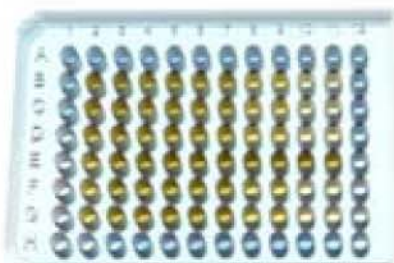


Figure 2 : Les différentes étapes de culture d'hépatocytes de truite -arc-en ciel .

dans chaque puits favorisant ainsi la formation d'agrégats. Le renouvellement du milieu est effectué tous les deux jours sous une hotte à flux laminaire, en remplaçant 2 ml de l'ancien milieu avec 2 ml du milieu frais.

c)-Induction des hépatocytes

Une fois les agrégats formés (environ 6 jours de culture), les cellules sont stimulées en remplaçant le milieu par du milieu frais, puis on ajoute 100µl de la substance à tester à différentes concentrations. Dans notre étude on a testé plusieurs groupes de composés tels les HAP, les PCB, les pesticides (Tableau 1). Les contrôles ou témoins négatifs sont obtenus à partir des cellules mises en contact avec le milieu de culture, pour les témoins positifs on a rajouté l'oestradiol dans le puits (E). On peut maintenir la culture jusqu'à 20 jours. Les différentes substances à tester et l'oestradiol sont rajoutées aux suspensions de cellules tous les 2 jours (6 fois), puis les cultures sont arrêtées, les milieux récupérés et le dosage de la VTG effectué à l'aide du test ELISA.

4-Dosage de la VTG dans le milieu de culture

a)- Principe

La Vitellogénine sécrétée par les hépatocytes de truite dans le milieu de culture est dosé par le test ELISA (*Ezyme Linked Immuno Sorbant Assay*). Ce test consiste à révéler par une réaction enzymatique la présence d'un complexe anticorps-antigène retenu sur les parois des puits d'une plaque de microtitration. L'antigène VTG est greffé sur les parois des puits en quantité connue et constante à partir d'une solution de VTG purifiée. L'anticorps (développé chez le lapin) est spécifique de la VTG de truite.

L'antigène libre (VTG) présent dans le milieu est dosé, en référence à une gamme étalon de VTG purifiée en concentration connue. En présence du substrat de l'enzyme associée, une coloration se développe, dont l'intensité est forte pour les plus faibles concentrations de VTG libre. (Cuisset *et al.*, 1991 ; Bon *et al.*, 1996).

b)- Dosage (Tableau 2)

Chapitre I : Etude *in vitro*

Etapes	Incubation	Temperature	Incrément	Dilution	Tampon	Quantité
Coating à 100ng/ml	16(nuit)	4°C	Tampon(Blanc) Plasma (Nuls) VTG à 2,5mg/ml (Bo, reste plaque)	- 100ng/ml 1/25000(100ng/ml)	Carbonate Carbonate Carbonate	200µl/puits

Pas de rinçage: Juste vidage de la plaque et essorage

Saturation	30min	37°C	PBS-TNPS		PBS-t-NPS	200µl/puits
------------	-------	------	----------	--	-----------	-------------

Trois rinçages avec PBS Tween

Anticorps (Ac I)	3heures	37°C	a) Gamme étalon VTG TAC: 12points	PBS-t-NPS/ échantillons	PBS-t-NPS	100µl/puits
			b)-Ac I stocké au 1/100 à -20°C	1/10 ⁵ (gamme, plasma)	PBS-t-NPS	100µl/puits
				1/2.10 ⁵ (Blanc, B ₀ et Nuls,)	PBS-t-NPS	200µl/puits

Trois rinçages avec PBS Tween

Anticorps (AcII)	45 minutes	37°C	Immunoglobulines de lapin (Dako Danemark)	1/2500	PBS-t-NPS	200µl/puits
------------------	------------	------	--	--------	-----------	-------------

Trois rinçages avec PBS Tween

PAP	30 minutes	37°C	PAP, Lapin (Dako Danemark)	1/5000	PBS-t-NPS	200µl/puits
-----	------------	------	----------------------------	--------	-----------	-------------

Trois rinçages avec PBS Tween

Révélation(OPD)	15 à 20min	ambiante	20,9ml Tampon citrate phosphate (TCP) +OPD + 5,5ml H ₂ O ₂ (à l'obscurité: papier aluminium)		TCP	200µl/puits
Arrêt	15minutes	ambiante	H ₂ SO ₄ à 4M (l'obscurité)			50µl/puits
Lecture à 190nm	Après 15min					

Tableau 2 : Différentes étapes de l'ELISA de VTG de Truite -arc-en ciel

5-Résultats

Nous avons mesuré le potentiel œstrogénique des produits testés choisis parmi des substances chimiques qu'on retrouve dans le milieu naturel. Les résultats obtenus nous ont permis de les classer en quatre groupes selon leurs effets observés sur l'activité oestrogénique. Parmi ces produits, deux PCB sont capables d'induire la synthèse de la VTG sur des cultures primaires d'hépatocytes de façon dose réponse : le mélange commercial DP₆ et le PCB77 dont l'activité est inférieure de 7 à 29 fois par rapport à l'effet de l'oestradiol (E) (Figure 4B). Ces résultats sont similaires à l'étude *in vitro* menée par Nesaretnam *et al.*, 1996 sur des cellules humaines (MCF7) exposés au PCB77 et dont il confirme l'oestrogénité de ce composé. En général l'oestrogénicité des PCB dépend de la structure de celui-ci, c'est-à-dire de son degré d'ortho chloration et de sa possibilité de fixation d'un groupement hydroxyle en position *para*. Ces résultats montrent que le mélange commercial DP6 est significativement oestrogénique avec un pouvoir 13% supérieur à celui de l'oestradiol.

Les pesticides, cyperméthrine et carbaryl, provoquent une inhibition de la VTG (Figure 4C). Le même effet a été observé dans des cellules mises en contact avec les HAP plus précisément le B(a)P et le naphthalène. Dans de notre cas on ne peut pas parler d'un effet antagoniste, puisqu'on ne sait pas à quel niveau ces produits agissent sur les cellules, soit il s'agit d'une perturbation au niveau de l'exocytose de la vitellogénine, soit une perturbation de la synthèse de cette protéine, ou simplement une toxicité cellulaire excessive de ces composés testés. Il aurait été intéressant de compléter nos résultats par des données plus précisant l'effet de ces composés sur l'inhibition de la VTG, en testant ces composés avec l'oestradiol dans le même puits. Ceci nous aurait permis de savoir si ces composés sont antagonistes ou pas.

Le test *in vitro* nous permet juste de connaître le potentiel oestrogénique éventuel d'un substrat mais pas les mécanismes d'action des polluants sur les récepteurs ou la métabolisation.

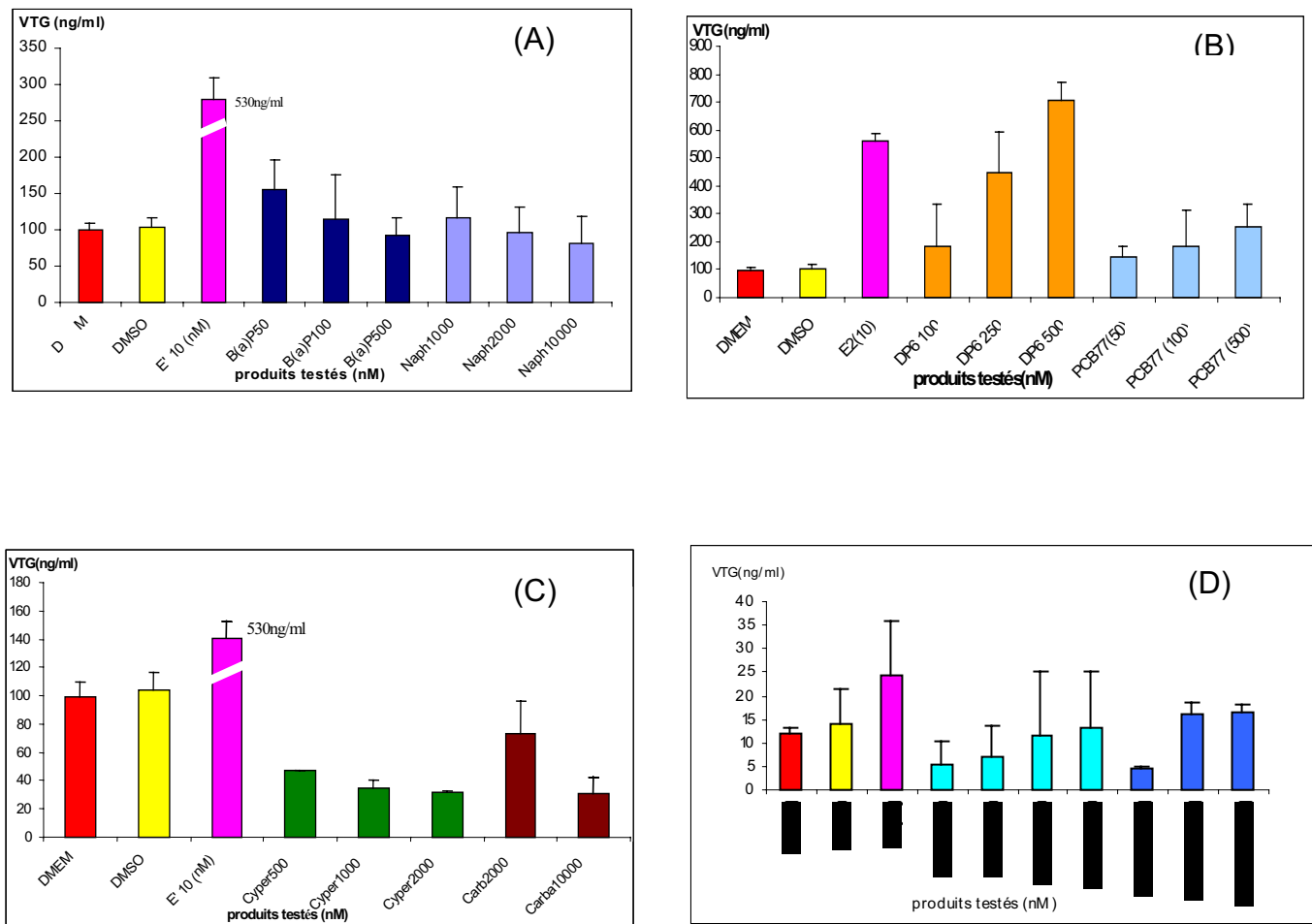


Figure 3: Pouvoir oestrogénique des contaminants testés

- (A): Induction en relation dose-réponse
- (B): Induction inverse (corrélation négative)
- (C): Inhibition en relation avec dose
- (D): Inhibition inverse

CHAPITRE II: ETUDE *IN VIVO*

Ce chapitre, présente des résultats expérimentaux obtenus chez le poisson, le turbot, (*Scophthalmus maximus*) et chez un bivalve, la moule (*Mytilus edulis*)

D'une part, nous avons recherché les variations des taux de plusieurs stéroïdes circulant dans le plasma de turbot après exposition à différents polluants, et observé les anomalies histologiques au niveau de certains organes (gonades, foie et intestin).

D'autre part, nous avons étudié les effets éventuels des contaminants sur la production de la protéine « VTG-like » au niveau des gonades chez la moule et observé la structure histologique des tissus reproducteurs pour tenter de mettre en évidence d'éventuelles perturbations du cycle de reproduction.

Avant de décrire les différentes études expérimentales auxquelles nous avons procédé, il est important de rappeler l'utilisation dans notre vie quotidienne de chaque produit testé. Notre modèle *in vivo* devrait faciliter l'analyse de certains effets déjà observés *in vitro*. Il faut ajouter également que dans la perspective d'utiliser ce modèle dans le domaine de l'écotoxicologie aquatique (cas des études en mésocosme), il semblait intéressant de pouvoir collecter quelques résultats sur des expositions en aquarium avant de passer à une étude en mésocosme.

I Les produits testés

1- Le pétrole : les hydrocarbures

a) Généralités

Le pétrole, « du grec *petrelaion* = huile de pierre», est composé de matières organique comportant :

- des *carbures saturés* (paraffiniques) de formule $C_n H_{2n+2}$ ($5 \leq n \leq 15$) (les bitumes correspondent à des carbures saturés de même formule avec $n > 15$, mais la terminologie est fort complexe et les produits nombreux), liquides à 20°C et de teinte d'autant plus sombre qu'ils sont denses (0,83 à 0,96, de toute façon plus légers que l'eau),

- des *hydrocarbures cycliques* naphténiques de formule $C_n H_{2n-3}$ et des *hydrocarbures cycliques aromatiques* de formule $C_n H_{2n-6}$.

La genèse du pétrole résulte de la maturation de dépôts de matière organique par la succession de deux processus appelés diagenèse et catagenèse (Tissot & Welte, 1984) :

-La diagenèse correspond aux transformations chimiques, biochimiques et physiques que subit le système organique/sédiment, dans les conditions de température et de pression modérées liées à un enfouissement ne dépassant pas 1000 mètres. La transformation de la matière organique donne un matériel appelé Kérogène.

-La catagenèse : la matière carbonée très réduite subit un craquage thermique, aboutissant à une séparation entre une *phase fluide* (huiles et gaz mobiles: on parle de fenêtre à huile pour désigner ce domaine de pression/température car c'est à cette étape que l'on observe des migrations et donc des accumulations) et une *phase solide* formée par des résidus carbonés (résidus aromatiques).

Des stades ultimes (métagenèse) peuvent conduire, au-delà de 4 km de profondeur à du graphite cristallin et à une libération de méthane (CH₄).

b) Effets sur la reproduction

Les HAP qui contiennent une composante du pétrole brut, ont été classés parmi les substances qui sont suspectées avoir un effet sur le système endocrinien par l'Agence Européenne de Protection de l'Environnement (EPA).

Une analyse a porté sur 263 femmes pour lesquelles on possédait des données de surveillance prénatales individuelles valables, pouvant servir à mesurer les taux d'HAP, ainsi que des échantillons de sang prélevés au niveau du cordon ombilical ou chez la mère. La totalité des femmes ont présenté des taux décelables d'au moins un HAP. Après correction des données en fonction de plusieurs autres facteurs, les auteurs ont observé une corrélation significative entre les taux de HAP et une diminution du poids à la naissance ($p = 0,02$) et du périmètre crânien ($p = 0,04$) (Perera *et al.*, 2003).

Chez le poisson la plupart des cas, ils sont anti-oestrogéniques et inhibent le développement ovarien en réduisant le taux d'oestradiol plasmatique qui provoque une baisse du taux de vitellogénine plasmatique (Johnson *et al.*, 1998). Chez le turbot une étude menée par Arukwe et Goksoyr en 1998, a montré que les HAP ont une action directe sur les cytochromes P450, et par conséquent ils sont responsables de la réduction du taux d'oestrogène endogène dans le plasma.

Le but de notre étude est d'analyser l'effet sur les systèmes de reproduction, d'un mélange des trois familles de composés constituant le pétrole : les hydrocarbures saturés (alcanes), les hydrocarbures aromatiques et les résines et asphaltènes. Le

Composés	Moyenne (mg/kg)	Ecart type	Coefficient de variation
Naphtaléne	1191	44	3,7
C1-naphtaléne	3445	88	2,5
C2-naphtaléne	5194	264	5,1
C3-naphtaléne	3096	58	1,9
Acenaphthlene	92	7	7,7
Fluorene	43	4	9,2
Phenanthrene	248	38	15,2
Anthracene	281	15	5,5
C1-phen/anthr	0		
C2-phen/anthr	487	45	9,3
Dibenzothiophene	519	44	8,5
C1-dibenzothiophene	162	11	7
C2-dibenzothiophene	322	30	9,2
Fluoranthène	371	34	19,5
Pyrene	12	2	11,7
Ben(a)anthracene	27	3	4,2
Chryséne	0		5,1
C1-chryséne	62	3	8,3
C2-chryséne	116	6	
Ben(b)fluoranthène	148	12	

Tableau 1: Composition du pétrole du Mer du Nord (NSO)

pétrole utilisé pour les expositions est celui extrait en Mer du Nord (North Sea Oil =NSO) (Tableau 1)

2- Alkylphénols éthoxylates :

a) Structure et caractéristiques chimiques

Les alkylphénols constituent une importante famille de produits chimiques. L'élément de base de la molécule est un noyau phénolique sur lequel est substitué, généralement en position para, un radical octyl, nonyl, ou dodécyl . La molécule comprend un nombre variable de groupes :

éthoxylates (-CH₂-CH₂-O-) dans le groupement fonctionnel -OH du phénol. Les alkylphénols dont le nombre de carbones de la chaîne alkylé est comparé de 9 atomes, sont dits nonylphénols (NP), et constituent environ 80 % des alkylphénols en usage et les octylphénols (8 atomes de carbone) constituent l'essentiel des 20 % restant. Le nonylphénol éthoxylate (NPEO) est en cours d'évaluation au niveau européen conformément au règlement (CEE) n°793/93 du Conseil concernant l'évaluation et le contrôle des risques par des substances existantes.

La dégradation des alkylphénols se caractérise d'abord par une perte progressive de groupes éthoxylates pour former des alkylphénols à courte chaîne, puis du nonylphénol ou de l'octylphénol selon la substance mère, les produits de dégradation ultimes sont le CO₂ et l'eau. De plus, l'oxydation du groupe alcool-OH en groupement -COOH génère des acides carboxyliques comme l'AP1EC et l'AP2EC. C'est pourquoi leur suivi dans l'environnement porte surtout sur les sous-produits des alkylphénols plutôt que sur les substances mères. (Bennie, 1999).

b) Domaine d'utilisation des nonylphénols:

Les NPEs et leurs produits de dégradation (ex. le nonylphénol [NP]) ne sont pas produits de façon naturelle et leur présence dans l'environnement est entièrement attribuable à **l'activité humaine**.

Le domaine industriel représente presque 55% du volume total des rejets d'alkylphénols dans l'environnement. Les activités qui utilisent ces produits de façon importante sont la synthèse d'émulsifiants (nonylphénol éther sulfates, nonylphénol éther phosphates), l'industrie textile et la production de pâte à papier, le raffinage du pétrole, le nettoyage en milieu industriel, institutionnel et domestique, la production de textile et la production du cuir (Metcalf *et al* 1996).

En agriculture (30% du volume de rejet total), ils sont utilisés comme adjuvants destinés à faciliter la dispersion des matières actives. Ils sont utilisés comme herbicides sous l'appellation fomesfan, et aminocarbe au Canada, (insecticide interdit de nos jours). Ils ont été commercialisés de façon systématique avec un nonylphénol polyéthoxylé pour un et du nonylphénol pour le second (Sundaram *et al.*, 1980 ; ACTA, 1998).

Ils ont été utilisés pendant un temps dans les produits d'entretien ménager mais de nos jours leur utilisation est pratiquement abandonnée en Europe (Ahel *et al.*, 1994). Ils constituent 15% du volume total de rejet dans Certains nonylphénols ont été employés dans la formulation de produits cosmétiques et dans la fabrication des produits contraceptifs utilisés comme spermicides (Nimrod & Benson, 1996).

c) Le devenir des alkylphénols dans l'environnement

Le NP et les NPEs pénètrent dans l'environnement principalement sous forme d'effluents (liquides et boues) des usines, mais également par des rejets directs selon le domaine d'utilisation :

La présence des alkylphénols dans l'environnement et ses effets néfastes sur les êtres vivants sont devenus des préoccupations importantes du fait de leur comportement dans l'environnement qui se traduit par une contamination ubiquiste des milieux aquatiques, ainsi que d'une utilisation importante dans notre vie quotidienne. En France comme ailleurs, des quantités importantes d'alkylphénols sont rejetées dans les eaux de surface chaque année. On estime à plus de 300 000 tonnes la production annuelle mondiale d'alkylphénols (White *et al.*, 1994). Des études ont montré qu'en Angleterre par exemple presque 37% des nonylphénols utilisés se retrouveraient finalement dans les milieux aquatiques alors que 47% seraient répandus dans l'environnement terrestre (Montagnani *et al.*, 1996). Les alkylphénols ont été introduits sur le marché des produits chimiques en 1940: ils forment le 2ème groupe de surfactants non ioniques à usage commercial et représentent 6% de la production totale de surfactants et 25% de la production totale de surfactants neutres aux Etats-Unis (Ahel & Giger, 1985 ; Naylor *et al.*, 1992 ; Nimrod & Benson, 1996) .

Les dérivés éthoxylés du nonylphénol (NPEs) peuvent subir plusieurs transformations. Le mécanisme de dégradation de ces substances est complexe mais, en général, les produits intermédiaires et finaux du métabolisme sont plus persistants

que les NPEs dont ils sont issus. On pense que ces produits intermédiaires finissent eux aussi par se biodégrader.

En milieu aquatique, la biodégradation primaire des NPEs est rapide, mais les produits qui en résultent sont modérément persistants, notamment dans des conditions anaérobies. Selon les données disponibles, le NP, ses dérivés moins éthoxylés et ses dérivés carboxylés sont persistants dans les eaux souterraines (Ahel *et al.*; 1994). De plus, le NP peut être modérément persistant dans les sédiments et semble aussi être persistant dans les déchets dans des conditions anaérobies, mais mieux dégradé dans le sol en conditions aérobies.

d) Effets sur la reproduction

Plusieurs études ont montré que les alkylphénols présentent une activité oestrogénique envers les vertébrés tels que les poissons, les amphibiens, les mammifères et les oiseaux (Joblin & Sumpter, 1993 ; White *et al.* ; Gray & Metcalfe, 1997) et qu'ils pourraient donc influencer le système endocrinien d'un organisme exposé à ces substances. Par contre, à notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée sur les invertébrés. Plus la longueur de la chaîne éthoxylée diminue plus l'activité oestrogénique augmente : c'est pour cela que le nonylphénol est l'alkylphénol qui a le plus fort pouvoir oestrogénique.

White en 1994 a montré par des tests *in vitro* sur des mammifères que le nonylphénol et ses dérivés éthoxylés se lient de façon agonistes aux récepteurs des œstrogènes. D'autres études sur des cultures d'hépatocytes de truite arc-en-ciel, montrent une induction de la production de la VTG qui apparaît à des concentration de l'ordre du µg/l dans le milieu de culture selon une réaction de type dose-réponse (Jobling & Sumpter, 1993 ; Lech *et al.* , 1996). Sur le même modèle animal mais *in vivo*, l'étude a montré que des concentrations entre 20 et 50µg/l de nonylphénol induisaient la production de la VTG et inhibaient la croissance des testicules (Jobling *et al.*, 1996). Chez des truites femelles cette même gamme de concentrations est susceptible de modifier la croissance et l'index gonadosomatique (IGS) (Ashfield *et al.*, 1998). Des données *in situ* Purdom *et al.* en 1994 ont alerté l'opinion en raison de

l'observation de poissons dont les gonades présentaient à la fois des territoires mâle et femelle en aval de stations d'épuration. Les substances en cause seraient des nonylphénols dont les effets oestrogéniques ont été démontrés *in vitro*.

Sur d'autres poissons tel que le saumon *Salmo salar* (Arukwe *et al.*, 1997) le nonylphénol a des effets sur les enzymes hépatiques de métabolisation des stéroïdes (CYP3A), effets qui se traduisent par la métabolisation enzymatique de la testostérone pour de faibles concentrations (de l'ordre du µg/L). Par contre, aux concentrations les plus élevées, l'effet est inversé. Des résultats analogues ont été observé chez le rat (Lee *et al.*, 1996).

Dans le cas des invertébrés, le rôle exact des hormones (androgène et œstrogène) reste encore inconnu. Ces hormones ont été trouvées chez de nombreux invertébrés (Leblanc, 1998; Ankley *et al.*, 1998). D'autres travaux expliquent que les invertébrés sont capables de générer des métabolites de testostérone par hydroxylation, conjugaison avec le glucose et le sulfate et aussi par réduction et déshydrogénation (Baldwin & Leblanc, 1994 ; Baldwin *et al.*, 1997, 1998). Chez les échinodermes et les gastéropodes marins, une exposition à des xénostrogènes augmente la croissance des ovocytes (Ankely *et al.*, 1998).

II Démarche expérimentale

A- Modèles animaux

1- Modèle Vertébré : Le turbot *Scophthalmus maximus*

a)- Présentation du modèle

Systematique

Ss Embranchement : Vertébrés

Classe : Ostéichthyens

Ss Classe : Actinoptérogens

Super ordre : Téléostéens

Famille : Scophthalmidés

Genre : *Scophthalmus maximus*



Lieu de vie : C'est un poisson côtier qui s'approche du littoral à la belle saison. Dans sa première année, il demeure sur les plages de sable. Au fur et à mesure qu'il

Chapitre II: Etude *in vivo*

grandit, il s'éloigne des eaux littorales pour rejoindre les fonds importants (au maximum à 80-100 m de profondeur). Il vit sur les fonds de pierre, de graviers ou de vase. Il vit en groupes plus ou moins nombreux en fonction des disponibilités alimentaires. Au fur et à mesure qu'ils vieillissent, les adultes tendent à descendre à des profondeurs de plus en plus importantes.

Morphologie : Le corps est haut, relativement épais, de forme arrondie. Les yeux sont sur le côté gauche. Les mâchoires et les mandibules sont munies de petites dents. Le corps est dépourvu d'écaillés. Celles-ci sont remplacées sur la face oculée (et dans une moindre mesure sur la face aveugle) par de menus tubercules osseux et aigus au toucher.

La coloration est très variable selon le substrat sur lequel repose le poisson. La face zénithale (gauche, à la lumière) est généralement gris-brun à brun violacé et couverte d'une multitude de taches brun sombre s'étendant jusque sur les nageoires. La face nadirale (droite) est le plus souvent claire, non pigmentée. Son pouvoir de mimétisme est très poussé : il parvient ainsi à reproduire les taches claires ou foncées des graviers ou des coquillages.

Reproduction : Le turbot devient apte à la reproduction à 3-5 ans (plus tard pour les femelles). Le frai se déroule près des côtes, par 10-40 m de fond :

- fin de l'hiver ou début du printemps en Méditerranée
- au cours du printemps dans le golfe de Gascogne
- durant l'été en mer du Nord

La ponte s'effectue sur des fonds de 80 m. La ponte est très abondante, 1 million d'œufs par kg de femelle. Les larves mesurent de 3 à 5 mm à la naissance. Elles sont d'abord pélagiques, vivant en pleine eau, symétriques et dotées d'une vessie gazeuse. Lorsqu'elles atteignent 15 mm, leur corps subit une métamorphose par rotation à 90° vers la gauche. Quand elles atteignent 2.5 à 3 cm, elles passent alors à un mode de vie benthique.

Les juvéniles rejoignent le littoral où ils poursuivent leur développement. La croissance est très rapide. Au bout d'un été, ils mesurent 6 cm et atteignent 30 cm à 3 ou 4 ans.

Nourriture : Les jeunes turbots vivent en eau peu profonde près des côtes et se nourrissent d'invertébrés benthiques. Par contre l'adulte est un prédateur actif qui se nourrit de petits poissons de fond qu'il chasse à l'affût ou en les poursuivant (jeunes gardes, lançons), de crabes, de mollusques, de vers.



Figure1 : Exposition de turbot à 0.5ppm de pétrole de la Mer du Nord (NSO), 0.1ppm nonylphénol et à 0.5ppm NSO+ 0.1ppm alkylphénols pour une durée de trois semaines

b)- Protocole d'exposition

Des turbots juvéniles d'environ 50 à 85 grammes sont maintenus en bac de polyéthylène aéré, d'une contenance d'environ 200 litres d'eau. Pour les expositions, les poissons sont répartis en 4 lots. Après 2 semaines d'acclimatation, ils sont exposés aux différents traitements chimiques (témoin, NSO, nonylphénol et mélange NSO+alkylphénol et des HAP) pendant trois semaines. L'exposition se fait par voie aqueuse. Un groupe témoin est maintenu en parallèle (Figure1).

Après exposition, les poissons sont mesurés, pesés et sacrifiés. Différents paramètres endocriniens sont mesurés dans le plasma (VTG, testostérone, 11cétotestosterone et 17 β -oestradiol). L'effet des contaminants sur les organes a été évalué par des coupes histologiques

2- Modèle Invertébré : La moule *Mytilus edulis*

a)- Présentation du modèle (voir 1er chapitre)

La moule utilisée dans cette étude est *M. edulis* son mode de vie et son mode alimentaire est identique à ceux de *M.galloprovincialis*.

b)- Les hormones stéroïdiennes chez les bivalves

L'intérêt pour la stéroïdogénèse chez les invertébrés marins a débuté au début des années soixante avec la mise en évidence d'hormones stéroïdiennes (Hagerman *et al.*, 1957; Botticelli *et al.*, 1961) et d'activités enzymatiques impliquées dans le métabolisme des stéroïdes (Lehoux & Sandor, 1970). Ces recherches furent approfondies chez les échinodermes et montrèrent le lien entre le métabolisme des stéroïdes et le cycle reproducteur (Voogt *et al.*, 1991; Hines *et al.*, 1992). Chez les bivalves cependant, les connaissances sont encore fragmentaires mais elles se développent depuis les années quatre-vingt dix. Les enzymes ont été les premières à être rapportées grâce à des études d'incubations avec des précurseurs. Différentes hydroxystéroïdes déshydrogénases (3 β -HSD ou 17 β -HSD) ont ainsi été mises en évidence de même que des aromatasés, des hydrolases et ce, dans différents tissus comme la gonade, la glande digestive, les muscles, le manteau, les intestins (Tableau 2). A l'heure actuelle, le métabolisme le plus étudié est celui de la testostérone du fait de l'apparition du phénomène d'imposex lié à la perturbation de son métabolisme (Son & Hughes, 2000; Ramon & Amor, 2001; Strand *et al.*, 2003; Axiak *et al.*, 2003; Straw *et al.*, 2004). Ceci ne peut que renforcer l'hypothèse d'une implication des stéroïdes dans la maturation sexuelle des bivalves. Chez ces derniers les stéroïdes

Chapitre II: Etude *in vivo*

ont été quantifiées dans la biomasse totale mais aussi dans la gonade, le manteau, les fluides corporels ou le pied chez les mâles et/ou les femelles. Le cas de *Mytilus edulis* (De Longcamp *et al.* ; 1970, 1974) ; *Mytilus galloprovincialis* (Morcillo *et al.* 1999) ; *Crassostrea gigas* (Hathaway, 1965), Mori *et al.*, 1965, 1966), Matsumoto *et al.* 1997), Morcillo *et al.*, 1998), Morcillo & Porte, 2000). Les concentrations en stéroïdes de la gonade présentent en effet des variations selon le sexe et l'état de maturation sexuelle ; chez différents bivalves. 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 (43ng/g) que chez les femelles (5,4ng/g) à un stade avancé de la maturation sexuelle. Cependant les concentration en 17 β -oestradiol sont comparables pour les deux sexes avec des quantités proches de 4,5ng/g (De Longcamp *et al.*, 1974).

Espèce	Auteur	Stéroïdes	Tissu
<i>Mytilus edulis</i>	De Longcamp <i>et al.</i> (1974)	T, E1, E2	gonade M et F
	Reis-Henriques <i>et al.</i> (1990)	P, A, T, E1, E2	biomasse totale M et F
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Morcillo <i>et al.</i> (1999)	T, E2	biomasse totale, NS
<i>Pecten hericius</i>	Botticelli <i>et al.</i> (1961)	P, composés oestrogéniques	gonade F
<i>Pecten maximus</i>	Saliot et Barbier (1971)	P	gonade F
<i>Crassostrea gigas</i>	Matsumoto <i>et al.</i> (1997)	E2, E1,	gonade M
		E2, E3	gonade F
<i>Patinopecten yessoensis</i>	Matsumoto <i>et al.</i> (1997)	E1, E2, E3	gonade F
		E2	gonade M
<i>Ruditapes decussata</i>	Morcillo <i>et al.</i> (1998), Morcillo & Porte (2000)	E2, T	biomasse totale, NS
<i>Mya arenaria</i>	Siah <i>et al.</i> (2002)	P	gonade M et F
<i>Elliptio buckleyi</i>	Gross <i>et al.</i> , (2003)	T, E2 et P	fluides corporels, manteau, gonade, pied, M et F

Tableau 2: Hormones stéroïdiennes répertoriées chez différents bivalves dans divers tissus. *Légendes:* F: femelle; M: mâle; NS: non sexé; E1: œstrone; E2: 17 β -œstradiol; T: testostérone, P: progestérone, A: androstènedione.

La variation saisonnière des concentrations en stéroïdes dans l'animal entier ou dans la gonade est synchronisée avec la maturation sexuelle. Les concentrations augmentent durant la gamétogenèse, que ce soit pour la progestérone (de 0,7 à 3,8 ng·g⁻¹) dans la gonade (mâles et femelles confondus) de *Mytilus edulis* (Reis-Henriques & Coimbra, 1990), le 17β-œstradiol (de 0,7 à 1,1 ng·g⁻¹) dans la gonade de femelles *Patinopecten yessoensis* (Matsumoto *et al.*, 1997) ou encore la progestérone (de 2,8 à 4,5 ng·g⁻¹) dans la gonade mâle et femelle de *Mya arenaria* (Siah *et al.*, 2002).

Bien que la présence de différentes enzymes ou hormones de la stéroïdogénèse soient rapportées chez les bivalves et que leur concentration ou activité puisse varier d'un sexe à l'autre ou durant la saison, le rôle des hormones stéroïdiennes n'est pas encore clairement décrit. Il est aussi important de souligner que l'action de ces hormones n'est possible qu'en présence de récepteurs hormonaux, et que le rôle des hormones stéroïdiennes n'est pas encore clairement décrit chez les bivalves. Par ailleurs des expérimentations *in vitro* et *in vivo* ont permis d'observer l'implication des stéroïdes dans divers processus physiologiques des bivalves. Mori (1968; 1980) fut le premier à rapporter des effets physiologiques induits par le 17β-œstradiol chez *Crassostrea gigas*. Ces effets sont liés d'une part à la maturation sexuelle et d'autre part à la différenciation sexuelle des individus.

Les études de Li *et al.* (1998) ont montré que la synthèse de protéines de réserve (vitellines) augmente dans les ovocytes de femelles de *Crassostrea gigas* exposées à l'E2. Cette induction sous contrôle œstrogénique de la synthèse de vitellines est parfaitement connue chez les vertébrés ovipares durant la vitellogenèse (Nagler *et al.*, 1987; Wallace & Jared, 1968; Motavkine & Varaksine, 1989) mais ce processus demeure encore mal décrit chez les bivalves ou les mollusques en général. Cependant, le même type d'effet inducteur de l'E2 ou de composés œstrogéniques tels que le nonylphénol ont pu être observés chez *Mya arenaria* (Blaise *et al.*, 1999) et *Elliptio complanata* (Gagné *et al.*, 2001). Les œstrogènes semblent donc impliqués dans la maturation sexuelle des femelles durant la vitellogenèse. Le site d'action reste encore à déterminer de même que la nature de la vitellogenèse puisque le ou les lieux de synthèse des protéines de réserve ne font pas l'unanimité.

Chez les bivalves, les informations sont beaucoup moins nombreuses quant à la caractérisation de vitellines et/ou de précurseurs. Albertini (1985) n'a pas pu mettre en évidence la présence d'une protéine de type "vitellogénine" dans l'hémolymphe de *Mytilus edulis* durant la période d'activité sexuelle. Lee et Hefferman (1991) ont également montré chez *Crassostrea virginica* et *Mercenaria mercenaria* que les oeufs sont majoritairement constitués de protéines (40 à 50 % du tissu sec). Parmi elles, une lipoprotéine de 56 kDa et de grande densité est majoritaire et pourrait effectivement être une vitelline. Osada *et al.*, (1992) furent les premiers à isoler, purifier et caractériser une protéine de réserve de type vitelline dans la gonade du pétoncle *Patinopecten yessoensis*. Cette protéine a une masse moléculaire de 400 kDa et sa purification partielle a permis de développer un anticorps qui lui est spécifique. Ainsi, grâce à des techniques "d'immunodiffusion" "d'immunoblotting", cette protéine a pu être localisée dans la gonade, la glande digestive et l'hémolymphe. Trois autres protéines d'une masse moléculaire semblable et une quatrième de 700 kDa ont également pu être détectées grâce à leur reconnaissance par l'anticorps. Il faut également souligner que l'anticorps produit à partir de la "vitelline" de pétoncle a également reconnu une protéine dans un extrait de gonade de *Chlamys farreri* et *Mytilus edulis*, ce qui tendrait à prouver la similitude de ces protéines chez les trois espèces. Suzuki *et al.*, (1992) ont aussi purifié une protéine de type vitelline chez *Crassostrea gigas*. Il s'agit d'une glycoprotéine de grande masse moléculaire (~ 500 kDa). Sa présence n'a été détectée par immunolocalisation que dans les ovocytes et l'enveloppe vitelline, ce qui tend à démontrer l'existence d'une réelle autosynthèse de vitelline dans les ovocytes de *Crassostrea gigas*. En outre les étude de Blaise *et al* (1999) ont montré la présence de protéine(s) dans l'hémolymphe de *Mya arenaria* dont les propriétés biochimiques s'apparentent à celle de la vitellogénine (VTG) des vertébrés ovipares.



Figure 2: Exposition des moules au pétrole du Mer du Nord 0.5ppm (NSO), au mélange NSO (0.5ppm) + alkylphénols (0.1ppm) (trois semaines)

c- Protocole d'exposition

Des moules (*Mytilus edilus*) d'environ 4,5 à 6 centimètres sont maintenues en bac de polyéthylène aéré (Figure 2), d'une contenance d'environ 200 litres d'eau.

Pour les expositions, les moules sont réparties en 2 lots. Elles sont exposées aux différents traitements chimiques pendant trois semaines. L'exposition se fait par voie aqueuse. Un groupe témoin est maintenu en parallèle.

Après exposition, les moules sont disséquées. Des paramètres biochimiques «VTG-like» sont mesurés dans les gonades et l'effet des contaminants sur les organes a été évalué par des coupes histologiques.

Les résultats sont présentés dans l'article 3.

B- Les hormones

1)-Extraction des hormones

Les hormones stéroïdiennes sont extraites du plasma avec un mélange de 1/1 acétate d'éthyle/cyclohexane(v/v). Deux millilitres de ce mélange sont ajoutés à 500µl de plasma. L'homogénéisation est réalisée par une agitation au vortex. Après 10 minutes à -80°C, on obtient deux phases distinctes : la phase organique et la phase aqueuse. La phase organique est récupérée dans un tube à hémolyse et mise de côté. Une deuxième extraction est effectuée sur la phase aqueuse.

Les phases organiques des deux extractions sont regroupées et les tubes sont laissés une heure sous un jet d'air puis évaporées sous vide au Speed Vac.

2)-Principe du test ELISA

La technique ELISA est une technique immuno-enzymatique de détection qui permet de visualiser un complexe antigène anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'antigène ou à l'anticorps.

On fixe des molécules d'Antigène (Ag) sur la surface des puits d'une plaque 96 puits ELISA (NUNC à fond plat) à partir de dilutions d'une solution mère. Dans notre expérience, cet Ag est de composition connue. Après avoir vidé et rincé les puits, les molécules d'Ag restent fixées sur les parois des puits.

On ajoute une solution d'Anticorps primaire (Ac 1aire) de cet Ag. On rince les puits. Les Ac aire non fixés sur les Ag sont retirés. Il reste les complexes Ag-Ac 1aire. On ajoute une solution d'Ac secondaire (Ac 2aire) anti Ac 1aire.

On rince. Les Ac 2aire non fixés sur les Ac 1aire sont retirés. Il reste les complexes Ag-Ac 1aire - Ac 2aire. On met en évidence les Ac 2aire fixés aux Ac 1aire eux même fixés aux Ag par le biais d'une réaction enzymatique colorée : Une enzyme préalablement liée à Ac 2aire réagit avec le substrat.

Cette méthode est utilisée pour mettre en évidence la présence d'un des deux réactifs : Ag ou Ac 1aire.

Ce test à été utilisé pour le dosage des stéroïdes : testostérone, 11-cétotestostérone et 17 β -oestradiol.

3)- Dosage de la 11-cétotestosterone (11-KT)

La 11-cétotestosterone est mesurée dans le plasma des poissons en utilisant la technique de dosage ELISA mise au point dans notre laboratoire (Cuisset *et al.*, 1994). Le protocole est décrit de façon détaillée dans cette publication. Brièvement, le principe repose sur la compétition, pour un même anticorps anti-11-KT, entre la 11-KT « libre » présente en quantité connue dans une gamme étalon, ou en quantité inconnue dans l'échantillon à doser et le « traceur enzymatique » 11-KT-AChE (11-KT liée à une enzyme : l'acétylcholinestérase (AChE)). Le complexe Ag-Ac obtenu est retenu aux puits de la plaque ELISA par la reconnaissance spécifique de l'AC 1aire par un Ac 2aire. Les réactifs en excès sont éliminés par lavage. Les complexes spécifiques sont (seuls) révélés par l'ajout de réactif d'Ellman (substrat de l'enzyme AChE). Une coloration jaune se développe, mesurable au spectrophotomètre à 405nm, dont l'intensité est plus grande pour de plus faibles concentrations d'hormone «libre».

La gamme de dosage utilisée est réalisée par dilutions successives de facteur 2 d'une solution d'hormone pure (Sigma aldrich); elle s'étend de 7,8pg/ml à 1000pg/ml. L'anticorps 1aire anti-11KT a été développé par le Dr. D. E. Kime (Sheffield, U.K.) (Kime & Manning, 1982). Le traceur enzymatique 11-KT-AChE a été synthétisé au laboratoire selon le protocole décrit précédemment (Cuisset *et al.*, 1994). L'anticorps 2aire (IgG monoclonal de souris-anti-IgG de lapin) provient de la société SPIBIO (Saclay, France). La fixation non spécifique de la 11-KT-AChE est déterminée par le dosage dans deux puits sans anticorps (Non Specific Binding).

Cette valeur est soustraite à toute les valeurs d'absorbance de tous les autres puits. L'expression des résultats obtenus se fait par référence à notre gamme étalon.

4)-Dosage du 17 β -oestradiol (17 β -E₂)

La technique de dosage du 17 β -oestradiol est dérivée du dosage de la 11-KT. Le principe en est exactement le même. Seuls changent l'Ac 1^{ère}, le traceur enzymatique, les durées d'incubation sur la plaque ELISA et la sensibilité du dosage. Pour plus de détails, se référer à la bibliographie (Nash *et al.*, 2000). La gamme de dosage utilisée est réalisée par dilutions successives de facteur 2 d'une solution d'17 β E₂ pur (SIGMA); elle s'étend de 7,8pg/ml à 16000pg/ml. L'anticorps 1^{ère} anti-17 β E₂ a été donné par le Dr. S. Zanuy (Torre-della-Sal, Espagne). Le traceur enzymatique 17 β E₂-AChE, ainsi que l'anticorps 2^{ème} (IgG monoclonal de souris-anti-IgG de lapin) proviennent de la société SPIBIO (Saclay, France).

5)-Dosage de la testostérone (T)

La technique de dosage de la testostérone (T) est dérivée du dosage de la 11-KT. Le principe en est exactement le même. Pour plus de détails, se référer à la bibliographie (Nash *et al.*, 2000). La gamme de dosage utilisée est réalisée par dilutions successives de facteur 2 d'une solution de T pure (SIGMA); elle s'étend de 7,8pg/ml à 16000pg/ml. L'anticorps 1^{ère} anti-T a été donné par le Dr. D. E. Kime (Sheffield, U.K.). Le traceur enzymatique T-AChE, ainsi que l'anticorps 2^{ème} (IgG monoclonal de souris-anti-IgG de lapin) proviennent de la société SPIBIO (Saclay, France).

C- La vitellogénine (VTG)

Le dosage de la VTG est effectué par ELISA directe. Cette technique repose sur la détection d'un complexe antigène-anticorps par un anticorps 2^{ème} marqué à la peroxydase. La gamme étalon de VTG et les échantillons à doser sont dilués dans le tampon de greffage, et incubés 1h à 37°C. Après avoir vidé et rincé la plaque, les puits sont saturés par dépôt d'une solution de « blocage », incubée elle aussi, 1h à 37°C. Après rinçage, l'Ac 1^{ère} anti-VTG de turbot est déposé (au 1/500) et incubé 1h à 37°C. La même incubation est pratiquée avec l'Ac 2^{ème} anti-IgG de lapin (1/200) (Biosense, Norvège). Le substrat de la peroxydase utilisé est l'orthophénylène diamine (OPD). La réaction est arrêtée par ajout de H₂SO₄ 4N. L'intensité de la coloration

développée est mesurée à 492 nm. L'anticorps 1aire anti-VTG a été obtenu chez le lapin par immunisation avec de la VTG de turbot purifiée (Minier *et al.*, 2000). La gamme étalon de VTG pure s'étend de 3,32 ng/ml à 3400 ng/ml.

D- Histologie

L'analyse histologique a porté sur le foie, l'intestin et les gonades chez le turbot, et la manteau, et pour certains échantillons, la glande Polichinelle chez la moule. Les fragments de tissus ont été prélevés sur les poissons immédiatement après leur sacrifice (tissus vivants) et aussitôt fixés dans un bain de formol à 4%. Les pièces ont ensuite été déshydratées par des bains croissants d'alcool puis éclaircies au xylène. Elles ont ensuite été incluses dans la paraffine. Les coupes de 3µm ont été colorées par une coloration combinée hématoxyline-éosine-safran.

Les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec une résine synthétique dont l'indice de réfraction est voisin de celui du verre. Prête à être observée au microscope photonique.

III Résultats et discussion

A- Le Turbot

1- Indice gonado-somatique

L'indice gonado-somatique (IGS) a été calculé pour l'ensemble des poissons prélevés. Cet indice exprime la masse relative des gonades par rapport à la masse corporelle totale. Les résultats montrent que cet indice est légèrement élevé pour les poissons mâles exposés au NSO et au mélange par rapport aux autres conditions. Mais aucune variation n'est significative chez les mâles : les contaminants ne paraissent pas avoir d'influence sur le développement de leurs gonades. (Tableau 3)

A l'inverse, une augmentation significative de l'IGS est visible chez les femelles exposées au nonylphénol. Cet indice est également plus élevé chez les femelles exposées au mélange, mais cette variations n'est pas significative

Le calcul de l'IGS a été utilisé dans plusieurs études comme indice pour vérifier l'état physiologique de certaines espèces au cours du cycle de reproduction. En halieutique, pour l'évaluation des stocks, cet indice a permis de classer les individus selon le stade de maturité. Il est considéré comme une clef mensuelle qui permet de lier le stade de

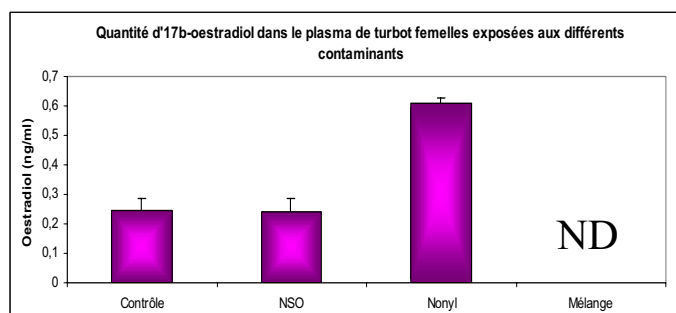
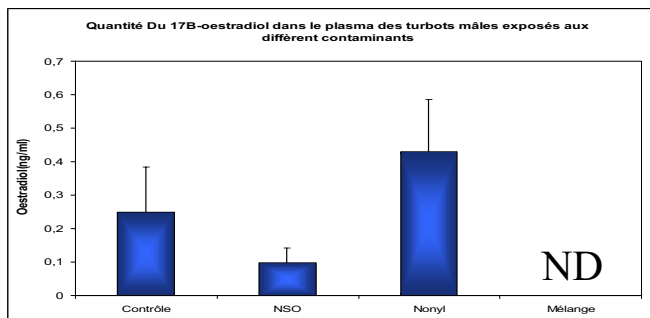


Figure 3 : Taux de 17-β estradiol mesurés dans le plasma des turbots mâles et femelles exposés aux différents contaminants.

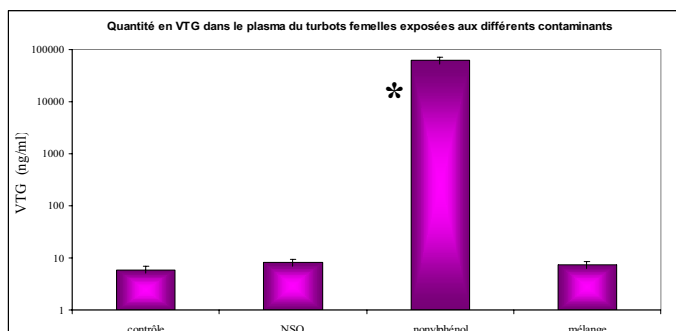
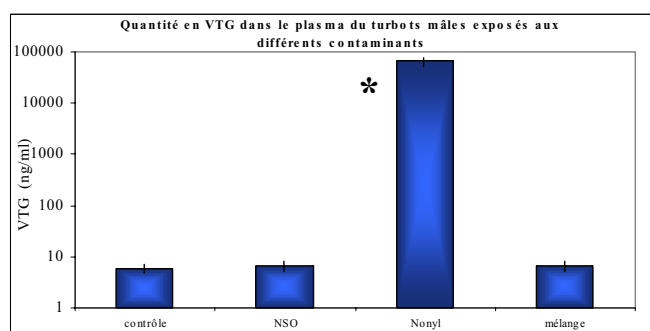


Figure 4: Taux du vitellogénine mesurés dans le plasma des turbots mâles et femelles exposés aux différents contaminants.

maturité d'individus à un groupe de géniteurs (Monitoring Programs Office MPO-Sciences, 2002)

Conditions	IGS femelle (%)	IGS mâle (%)
Contrôle	0,765(±0,260)	0,361(±0,079)
NSO	0,926(±0,298)	0,559(±0,239)
Nonylphénol	1,174(±0,190)*	0,330(±0,098)
Mélange	1,103(±0,292)	0,533(±0,122)

Tableau 3: Indice gonado-somatique (IGS%) et intervalle de confiance (p<0,05 Test Tuckey)

2- Paramètres plasmatiques

a) 17β Oestradiol

Les témoins ne montrent pas des taux significativement différents de 17β-E2 entre les deux sexes, ce qui s'explique par le fait qu'il s'agit de juvéniles. Par contre une forte quantité 17β-E2 à été enregistré chez les individus exposés au nonylphénol aussi bien chez les mâles (0,43ng/ml) que chez les femelles avec une moyenne de 0,6ng/ml. (Figure 3)

b) La Vitellogénine

La concentration de VTG dosée dans le plasma des poissons traités présente des variations significatives par rapport aux témoins. Une forte induction de la VTG chez les poissons exposés au nonylphénol a été observée dont la valeur moyenne de la VTG plasmatique est proche de 100μg/ml, aussi bien chez les mâles que chez les femelles (Figure 4). Ceci est parfaitement corrélé à l'augmentation très marquée des taux de 17β-E2 présent dans le plasma de ces mêmes individus.

c) Testostérone (T)

Les résultats des dosages de la testostérone plasmatique sont présentés figure 6. Pour les turbots mâles la quantité de T diminue de façon continue pour les individus exposés au NSO, au nonylphénol et au mélange respectivement. La quantité la plus élevée a été mesurée chez les turbots témoins de l'ordre de 0,15ng/ml.

Pour les femelles, seuls les individus exposés au NSO présentent une quantité significativement élevée par rapport au témoins avec une quantité de 0,09 ng/ml.

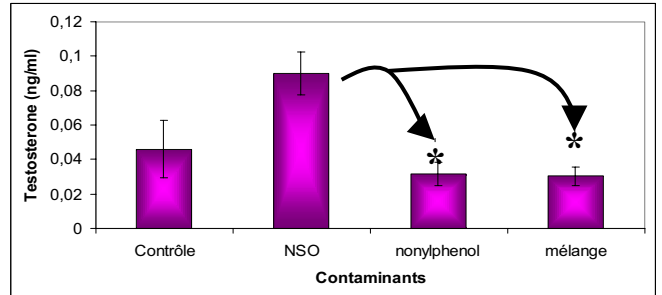
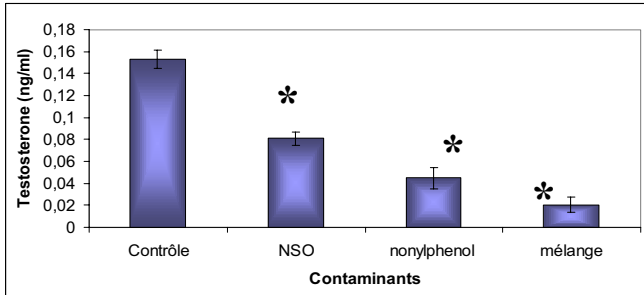


Figure 5 Taux de testostérone mesurés dans le plasma des turbots mâles (bleu) et femelles (rose) exposés aux différents contaminants

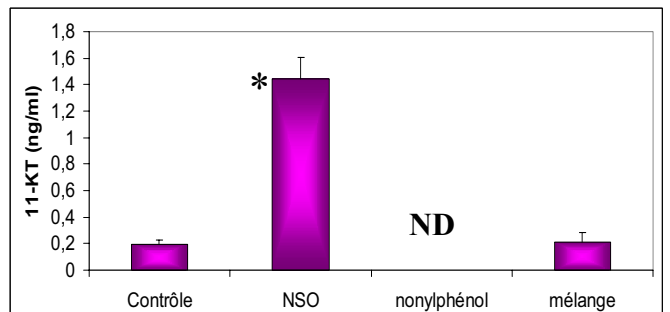
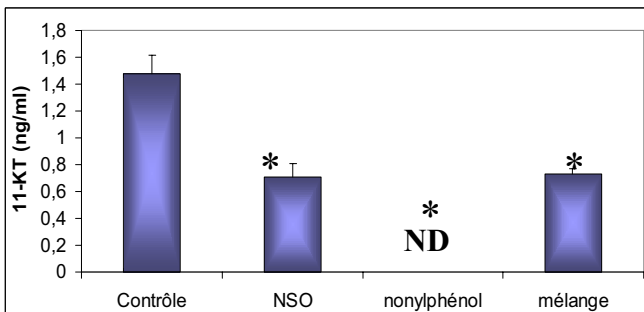


Figure 6: Taux du 11cétotestostérone mesurés dans le plasma des turbots mâles(bleu) et femelles (rose) exposés aux différents contaminants.

d) 11 Céto-testostérone (11-KT)

Le taux de la 11-KT a été mesuré dans le plasma de dix mâles et dix femelles pour chacune des expositions. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 6.

Chez les turbots mâles la quantité la plus élevée de 11-KT est mesurée chez les témoins correspondant à une moyenne de 1,4 ng/ml. Les taux sont significativement plus faibles ($p < 0,05$) chez les mâles exposés au NSO, au nonylphénol et au mélange. De la même façon les taux sont significativement inférieurs dans l'exposition au nonylphénol comparée au NSO seul ou au mélange.

Chez les turbots femelles, les individus exposés au NSO ont 7 fois plus de 11-KT ($p < 0,05$) dans le plasma que les témoins pour lesquels les taux sont inférieurs à 0,2ng/ml. En ce qui concerne les femelles exposées au mélange tout comme celles exposées au nonylphénol, la quantité de 11-KT n'est pas significativement différente des témoins.

Par ailleurs, on obtient des résultats analogues pour les femelles et les mâles exposés au nonylphénol dont la valeur est au dessous de la limite de détection du dosage (sensibilité à 90% $B_i/B_0 = 7\text{pg/ml}$).

En définitive, trois points importants qui apparaissent de ces dosages :

a)- de la même façon chez les mâles que chez les femelles, on remarque l'absence de 11-KT, pour les poissons traités au nonylphénol,

b)- chez les femelles, on observe un impact très marqué de l'exposition au NSO, qui se traduit par une augmentation très significative.

c)- ce dernier effet est contradictoire par rapport à ce que l'on mesure chez les mâles, pour lesquels les taux du 11-KT sont diminués en présence du NSO.

e)-Discussion des dosages des paramètres plasmatiques

La diminution significative d'androgène (T et 11-KT) chez les mâles semblerait suggérer une baisse d'activité enzymatique : il est possible que les enzymes impliquées (la 17 hydroxylase qui transforme la 17 hydroxyprogestèrone en T) et aussi la 11β -hydroxylase) soient inhibées chez les poissons soumis aux expositions citées. Une des voies principales connues d'origine de la 11-KT est sa synthèse à partir de la T (avec la 11β -hydroxytestostérone comme intermédiaire). Sans préjuger d'un changement (ou d'une baisse) de l'activité 11β -hydroxylase, la diminution des taux de son stéroïde précurseur peut à elle seule expliquer la baisse des taux de 11-

KT. Une autre hypothèse, ne peut être écartée, qui concernerait le métabolisme plus amont des stéroïdes : nous n'avons aucune donnée pour préciser à quel niveau agirait l'inhibition ou la baisse d'activité enzymatique, et il est envisageable que cette inhibition se fasse aussi bien au niveau de la synthèse, de la 17-OH-progestérone, de la progestérone ou encore de sa synthèse même à partir du cholestérol. Chez les mâles, l'oestradiol également voit ses taux abaissés (mais non significativement) dans l'exposition NSO par rapport au témoin; ceci, encore une fois, pourrait s'expliquer comme une diminution consécutive de celle du stéroïde précurseur qu'est la T par rapport à l'oestradiol.

Il est à noter, de façon paradoxale, que les résultats obtenus de la même exposition, sont à l'opposé de ceux trouvés chez les femelles. Chez les femelles, dans l'exposition NSO, la T et la 11-KT augmentent, mais le 17 β -E2 ne change pas significativement, par rapport aux contrôles. Comment interpréter, que les mêmes systèmes enzymatiques, dans les mêmes conditions d'exposition, soient inhibés chez les mâles et stimulés chez les femelles ?

D'autre part, si la présence de la T et du 17 β -E2 chez les femelles n'a rien de remarquable, la présence de 11-KT est totalement inattendue et n'est d'ailleurs pas détectée chez les femelles contrôles. Il est possible d'envisager le métabolisme stéroïdien chez les femelles, comme étant stimulé sur une des voies enzymatiques en amont de la testostérone, puisqu'on ne peut mettre en cause son utilisation pour la production du 17 β -E2, qui n'est pas altérée (les taux de 17 β -E2 sont aussi élevés chez les femelles soumises au NSO que chez les femelles contrôles). Quant au niveau surprenant de la 11-KT, il peut être envisagé comme une « voie de détournement » pour soustraire du sang une partie de la testostérone produite en excès. Chez les poissons, il est habituellement admis que la 11-KT est une hormone spécifique des mâles. Elle a d'ailleurs été utilisée comme base de sexage chez plusieurs espèces (Le Bail *et al.*, 1981 ; Bennetau-Pelissero *et al.*, 2000 ; Cuisset *et al.*, 1994). Toutefois il existe également des études rapportant la présence de cette hormone à des concentrations plasmatiques élevées chez les femelles. Par exemple chez l'esturgeon sibérien, *Acipenser baeri*, élevé en pisciculture, des taux très élevés (aussi élevés que chez les mâles) ont été mesurés chez les femelles atteignant les stades de fin de vitellogénèse, ce qui correspond à des poissons âgés de 7 ans (Cuisset *et al.*, 1995). Chez ces poissons, les taux plasmatiques de T sont également très élevés, en partie

apportée par l'aliment, dans lequel des taux élevés de stéroïdes ont été révélés (Pelissero *et al.*, 1991). Il a été démontré chez cette espèce d'esturgeon, que plusieurs tissus (cellules sanguines, interrénale et follicules ovariens) possèdent le matériel enzymatique nécessaire à la synthèse de la 11-KT à partir de 17-Hydroxy-progestérone, et chacun de ces tissus peut participer de ces taux élevés de 11-KT dans le sang. Une hypothèse était émise, qui expliquait ces synthèses inattendues de 11-KT par l'ovaire (les autres tissus tels que l'interrénal étant susceptibles d'en produire naturellement) comme un moyen de soustraire la testostérone du flux sanguin (Cuisset *et al.*, 1995).

Il aurait été intéressant de compléter nos résultats par des données (études) précisant les voies métaboliques (*in vitro*) de synthèse des stéroïdes de certains organes, en les testant chez les poissons témoins et chez les poissons soumis aux diverses expositions, aux temps T₀ (début d'exposition) et T₁₅ (fin d'exposition). Ceci nous aurait permis d'expliquer pourquoi certains composés testés modifient les taux plasmatiques de stéroïdes, en précisant comment ils interviennent sur les synthèses de stéroïdes sexuels.

Chez les poissons exposés au nonylphénol, on observe une diminution des taux plasmatiques de T et de la 11-KT chez les deux sexes, diminution significative chez les mâles pour la T et la 11-KT, et chez les femelles pour la 11-KT par rapport au témoins. A l'inverse, le 17 β -E2 et la VTG montrent une augmentation significative par rapport aux témoins, chez les deux sexes. Ceci sous-entend que ce composé stimule la production de 17 β -E2, ce qui n'est pas en contradiction avec l'hypothèse que toute la T ait été transformée en 17 β -E2. D'autre part, le nonylphénol a un effet oestrogénique bien connu chez d'autres espèces blennie vivipare : blennie vivipare *Zoarces viviparus* (Christiansen *et al.*, 1998) truite arc-en ciel *Oncorhynchus mykiss* (Chaput *et al.*, 2002), et qui est une fois de plus confirmé, chez cette espèce.

Chez les poissons soumis à l'exposition face au mélange, les taux de T, de 11-KT restent au taux normal (très faible) des contrôles en ce qui concerne les femelles. Ceci nous permet de conclure que la présence de l'alkylphénol inhibe l'effet du NSO seul. Pour les mâles, ces deux stéroïdes marquent une diminution significative par rapport au contrôle, diminution quasi identique à celle observée en présence du NSO seul. Les taux de 17 β -E2 chutent aussi bien chez les mâles que chez les femelles, passant sous la barre du seuil de détection du dosage (90% Bi/Bo=62 pg/ml). La faible

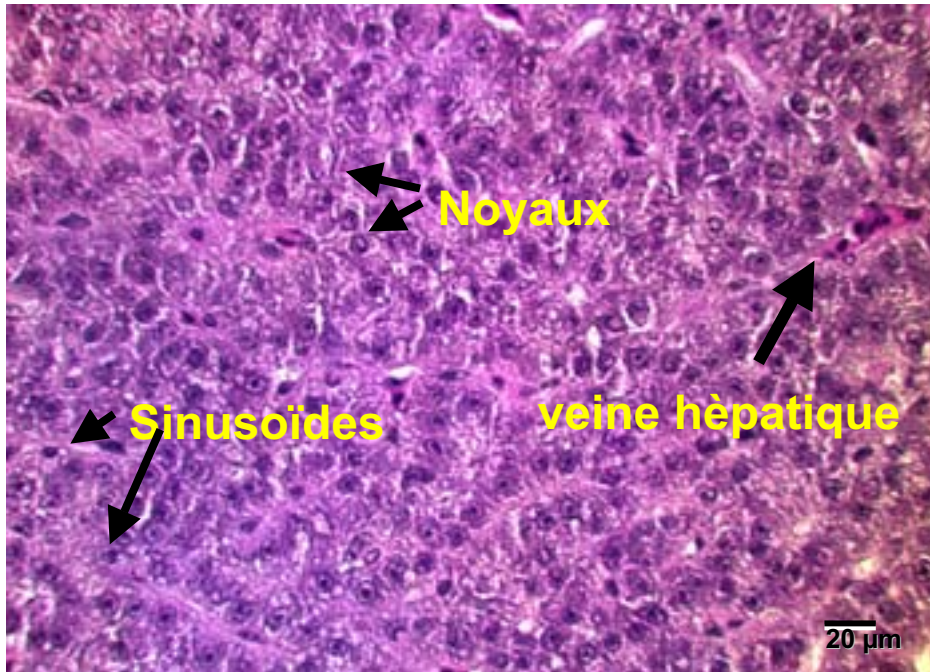


Figure 7 : Coupe histologique de foie de turbots témoins

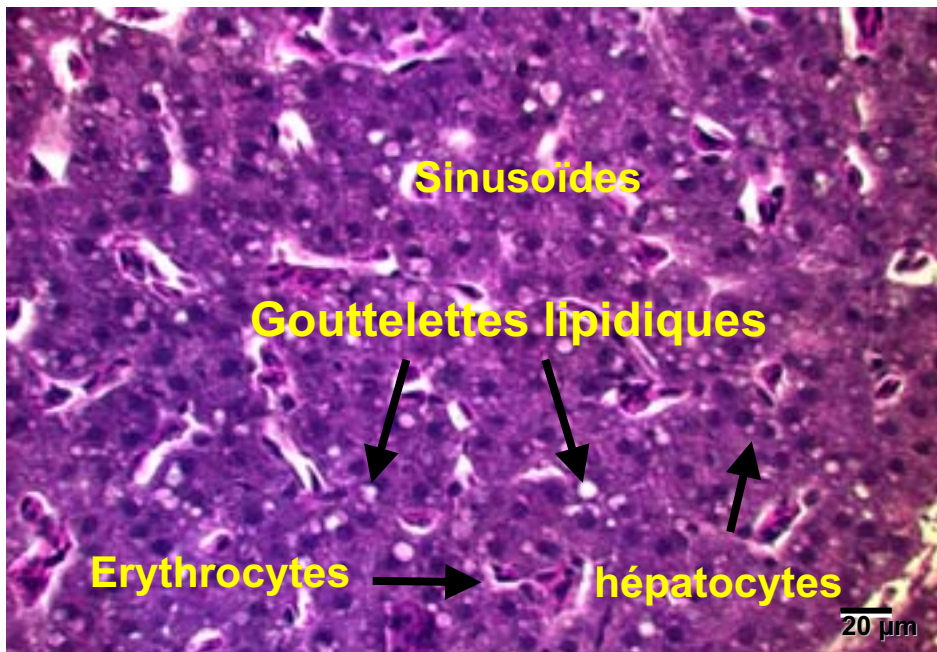


Figure 8 : Coupe histologique de foie de turbots exposés au NSO

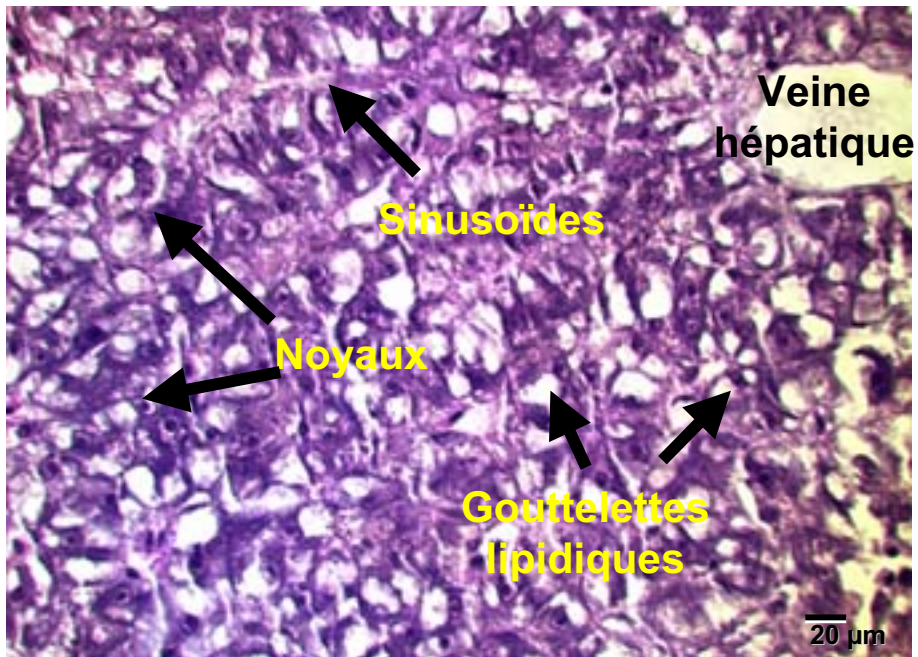


Figure 9 : Coupe histologique de foie de turbots exposés au nonylphénol

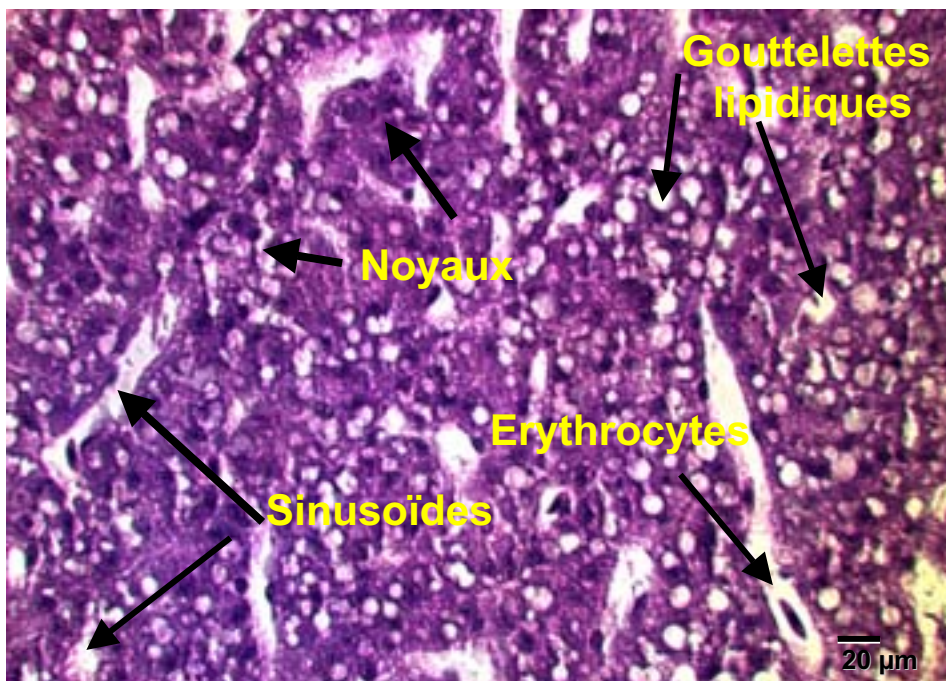


Figure 10 : Coupe histologique de foie de turbots exposés au mélange

dose de T mesurée chez les mâles et les femelles exposées au mélange expliquent l'absence du 17β -E2 dans le plasma des deux sexes.

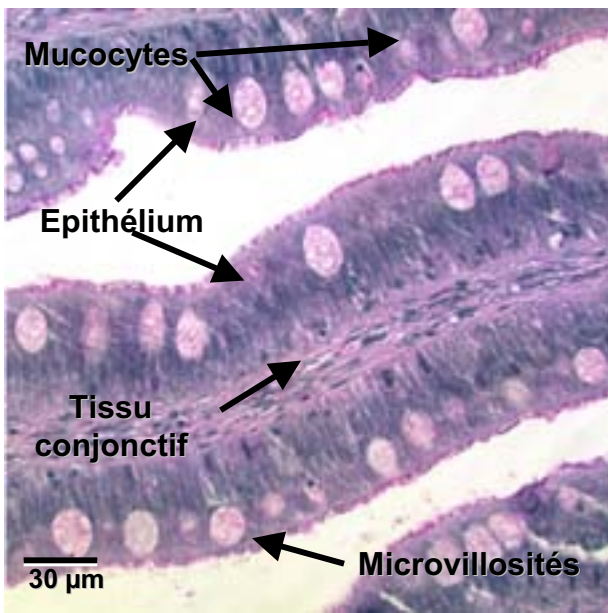
3) Histologie

a)- Foie

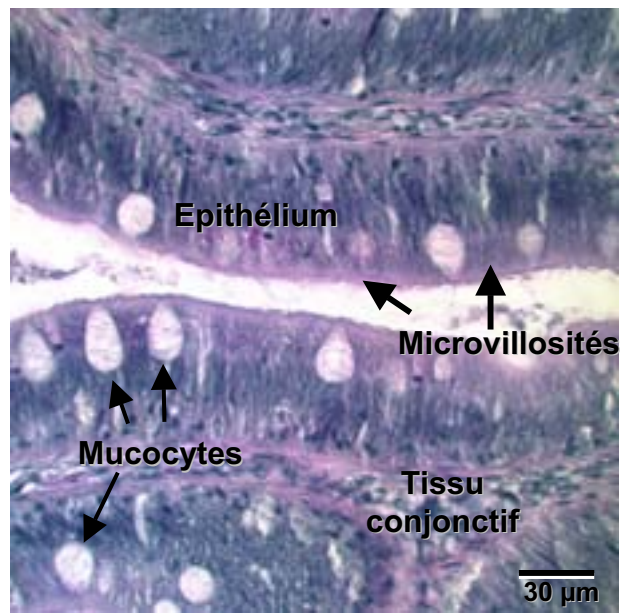
Chez les témoins, le parenchyme du foie est homogène. Les hépatocytes contiennent un noyau central rond et bien net. Les sinusoides sont étroits et difficiles à observer. Les vaisseaux sanguins, y compris les veines et les sinusoides hépatiques, contiennent peu de cellules sanguines (Figure 7). Chez les turbots exposés au NSO, la coloration des hépatocytes est plus dense que chez les témoins, et les sinusoides sont plus dilatés. De nombreuses cellules sanguines sont présentes dans les veines hépatiques, ainsi que dans les sinusoides. Les hépatocytes contiennent de grands globules lipidiques et les limites de cellules sont difficilement observables (Figure 8).

Après exposition au nonylphénol, le parenchyme du foie montre des inclusions lipidiques très grandes menant à une stéatose hépatique. Les sinusoides sont plus larges que chez les poissons témoins, mais pas autant que chez les poissons exposés au NSO (Figure 9). La concentration en cellules sanguines dans les veines et les sinusoides est normale. Le cytoplasme des hépatocytes est aussi clair que chez les témoins. Par contre, le foie des turbots exposés au mélange montre une combinaison des perturbations observées chez les animaux exposés au nonylphénol et ceux exposés au NSO séparément (Figure 10). Cependant, les stéatoses sont moins importantes que chez les turbots exposés au nonylphénol, alors que la dilatation sinusoidale est à peu près identique à celle observée chez les turbots exposés au NSO.

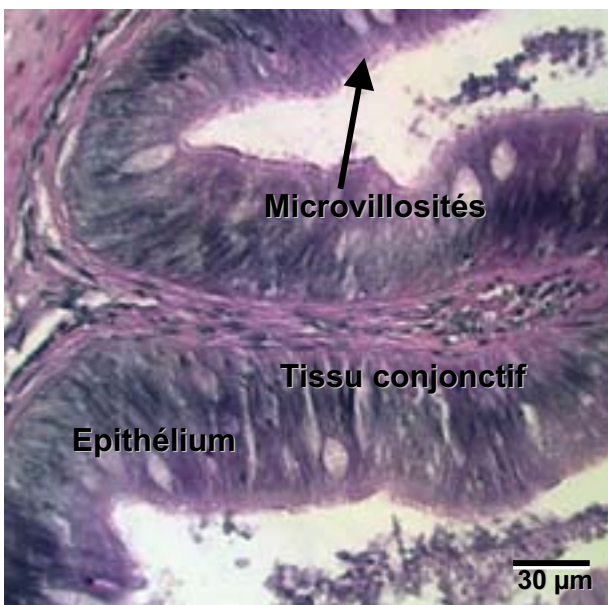
Une réponse hépatique similaire est par ailleurs observée fréquemment lors de contaminations chroniques chez des individus sauvages capturés dans les milieux naturels contaminés (Biageanti-Risbourg, 1990 ; Braunbeck *et al.*, 1990 ; Cormier & Racine, 1990). Ainsi des juvéniles de mullet et d'anguille capturée dans la lagune de Bages-Sigean (Golfe du Lion), présentaient des perturbations hépatiques analogues dues à la contamination par du cadmium et divers pesticides dont l'atrazine et le lindane. Une autre étude sur la lagune de Tunis, site qui, en 1985, au moment des captures, présentait divers types de pollutions d'origine urbaine, industrielle et agricole relativement élevées (Chauvet, 1986) montre que les hépatocytes des individus



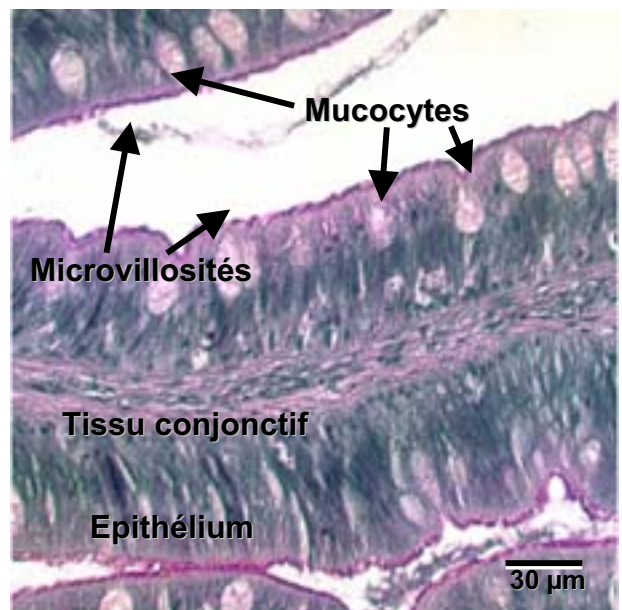
Témoin



NSO



nonylphénol



mélange

Figure 11 : Coupes histologiques de l'intestin de turbots exposés aux différents contaminants.

pêchés dans cette lagune possédaient une quantité anormalement élevée de globules lipidiques volumineux jugés symptomatiques d'une résistance cellulaire face à la mauvaise qualité sanitaire du milieu.

b)- Intestin

Les intestins des poissons exposés au nonylphénol ne présentent aucune différence significative par rapport aux témoins. Chez les poissons exposés au NSO ou au mélange, les microvillosités de l'épithélium de l'intestin sont réduites : « la bordure en brosse » est difficile à observer.

Les microvillosités jouent un rôle important dans l'absorption des aliments car elles augmentent les surfaces d'échange. Une meilleure compréhension de l'impact des polluants sur cet organe nécessite une analyse ultra-structurale susceptible de caractériser précocement les perturbations cellulaires. (Figure 11)

c)-Gonades

Les résultats de cette étude ont mis en évidence des effets chez les femelles ainsi que chez les mâles.

Chez les turbot femelles, l'exposition au pétrole brut de la Mer du Nord (NSO) conduit à une réduction de la densité en ovocytes du tissu ovarien (Figure 12B) comparativement aux ovaires des poissons témoins (Figure 12A). Cette baisse de la densité s'accompagne d'une importante vacuolisation du tissu ovarien. Une vacuolisation encore plus intense est observée chez les femelles exposées au nonylphénol (Figure 12C) chez lesquelles les ovocytes sont plus petits que chez les témoins ou chez les poissons exposés au NSO. De plus, de nombreux ovocytes présentent une vacuolisation du noyau (Figure 13B : astérisques) après exposition au nonylphénol. Les turbots exposés au mélange présentent les mêmes lésions que celles induites par le nonylphénol (Figure 12D). Par contre peu de perturbations sont observées chez les mâles (Figure 14). Cependant, on note une infiltration d'adipocytes (cellules graisseuses) dans le parenchyme spermatique (flèches) dont l'accumulation peut conduire à une vacuolisation partielle du tissu testiculaire (Figure 14C).

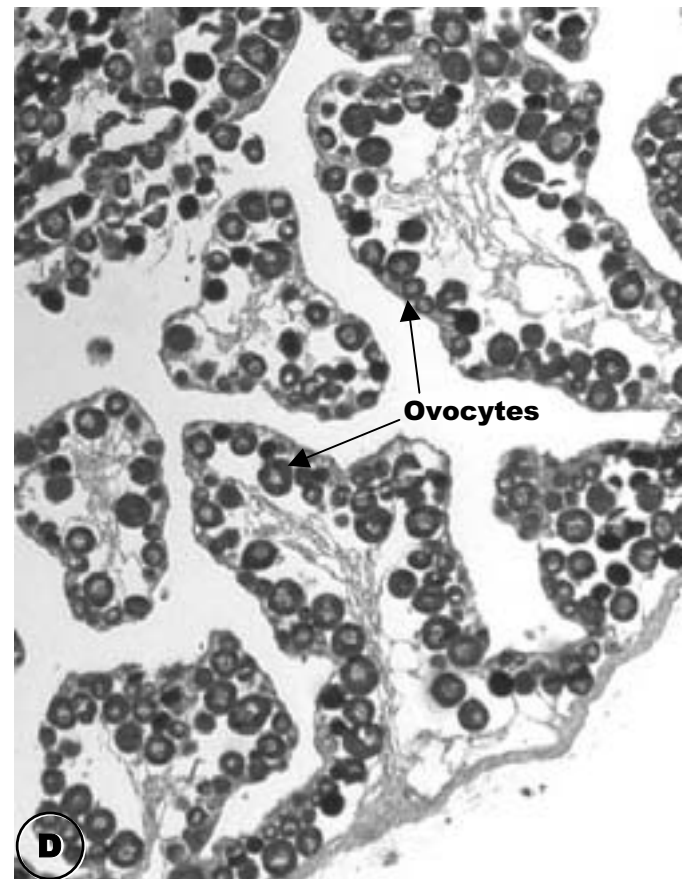
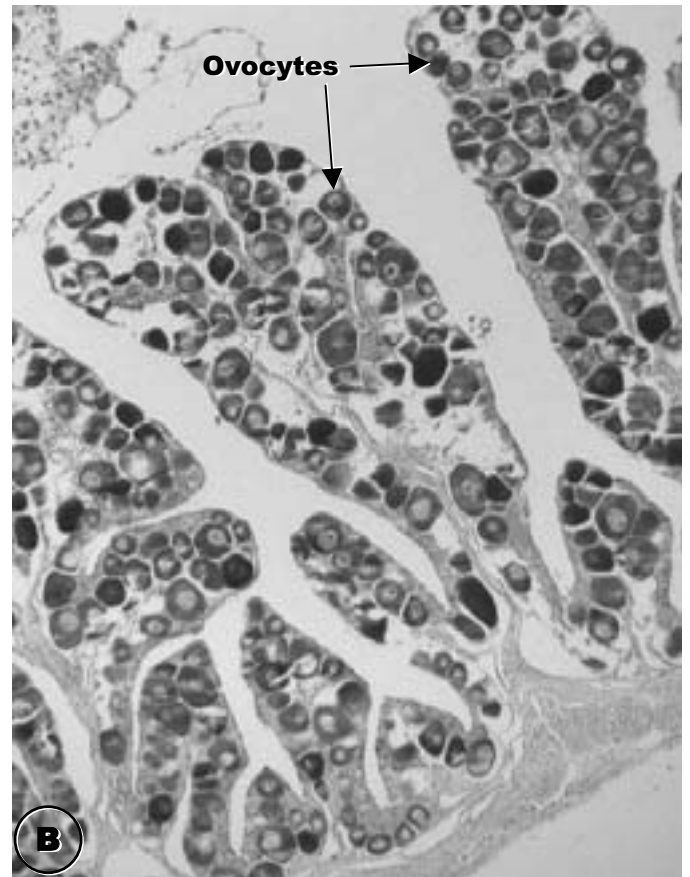
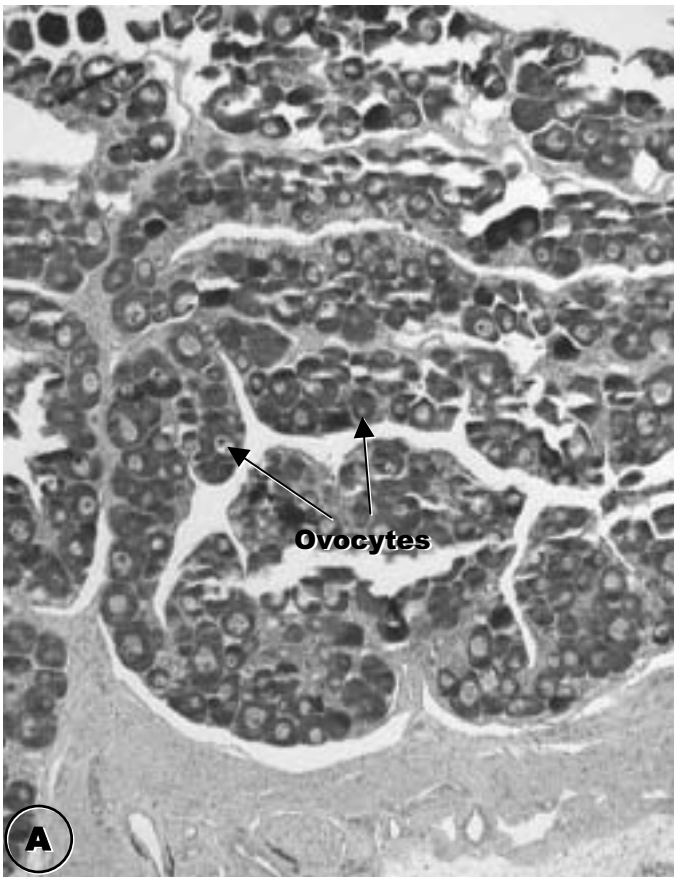


Figure 12 - Coupes d'ovaires de turbot. **A** : Témoin ; **B** : Pétrole brut de la Mer du Nord ; **C** : Nonylphénols ; **D** : Mélange Pétrole brut/ Nonylphénols. (Coupes paraffine 3 μ m ; hématoxyline-éosine-safran)

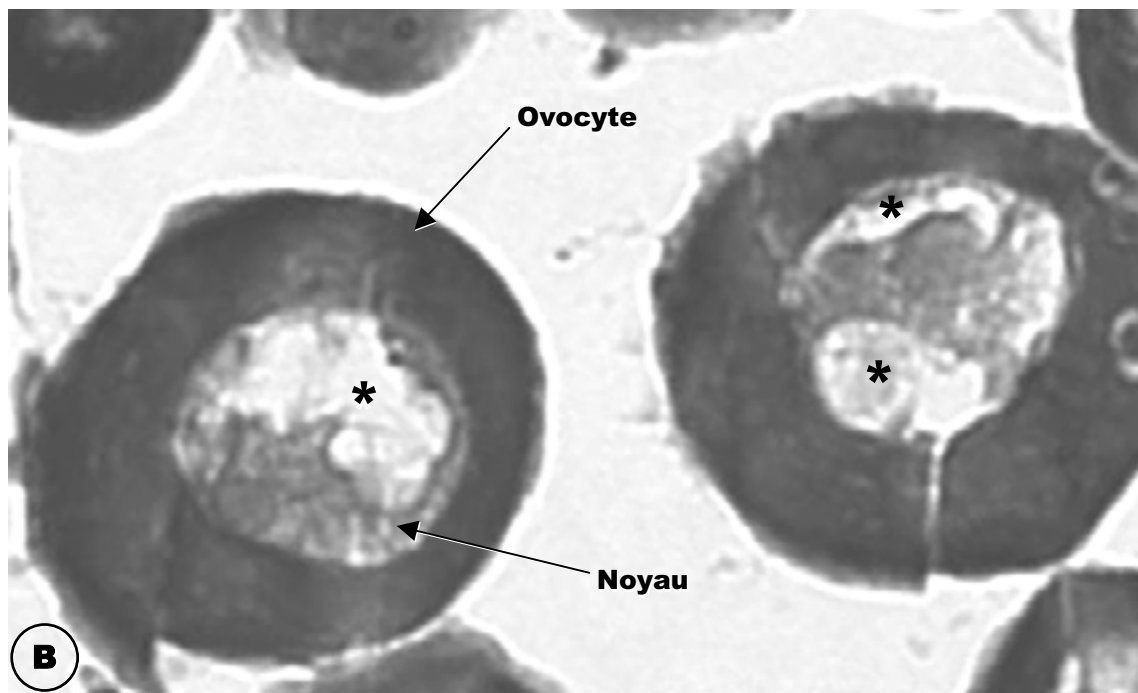
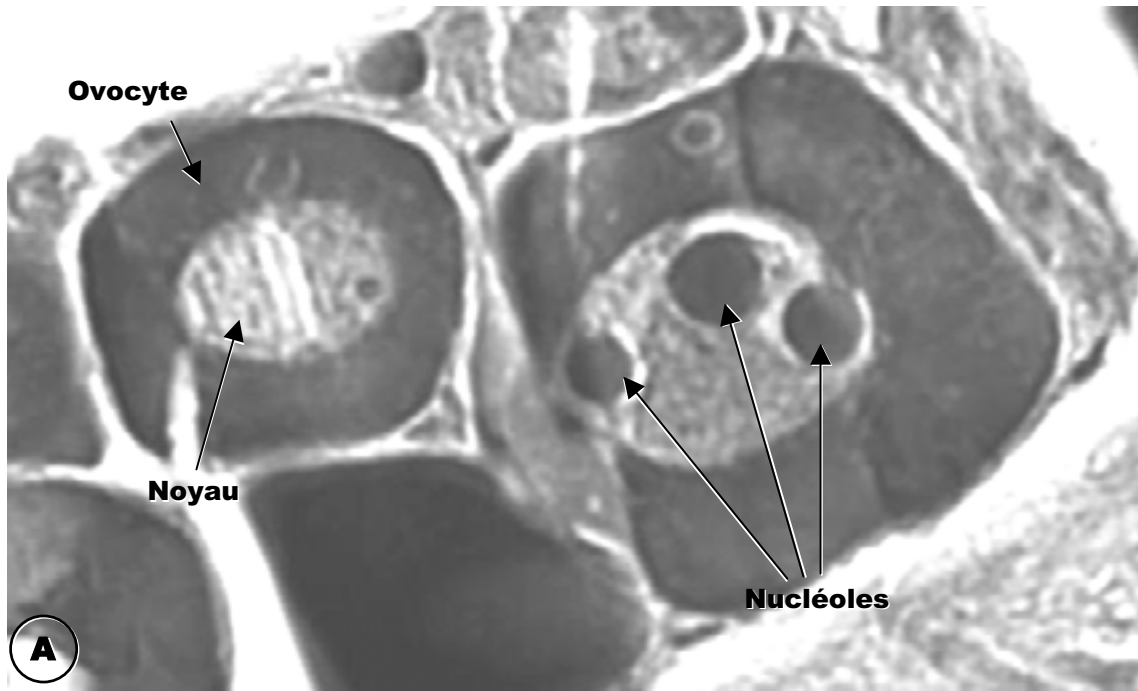


Figure 13 – Coupes d'ovaires de turbot : détail des ovocytes. **A** : Témoin ; **B** : Nonylphénol. (Coupes paraffine 3 μ m ; hématoxyline-éosine-safran)

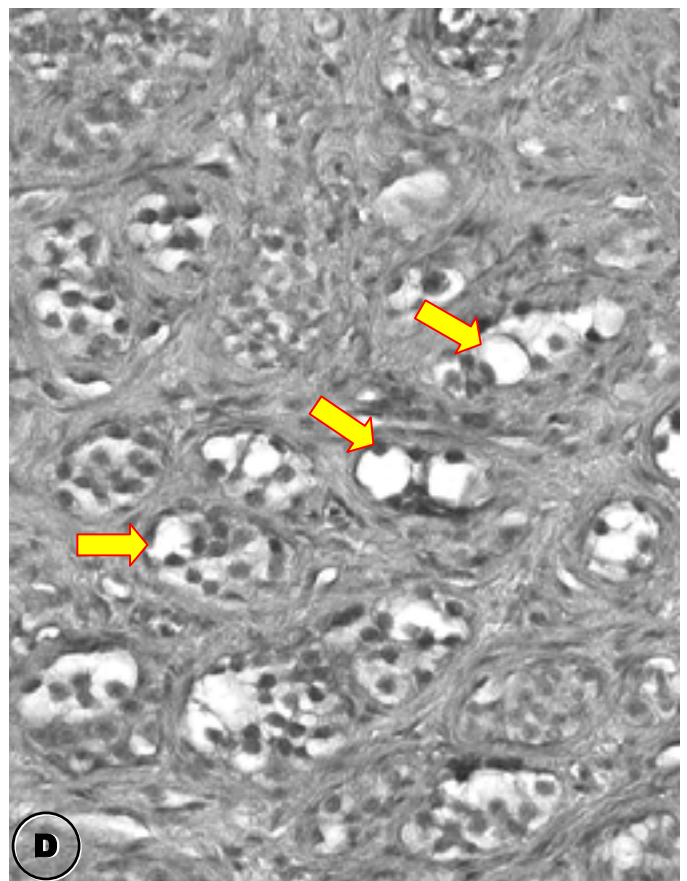
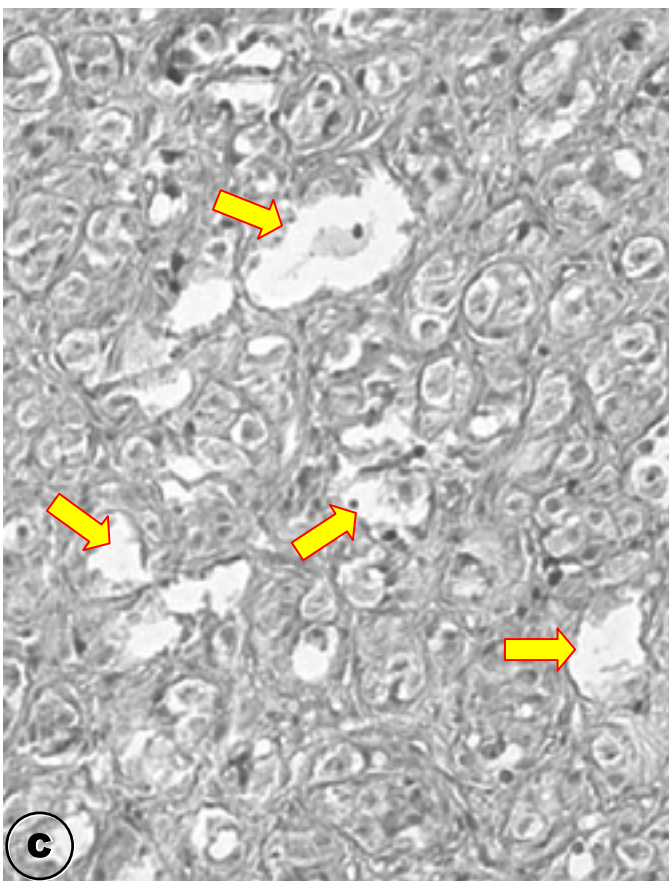
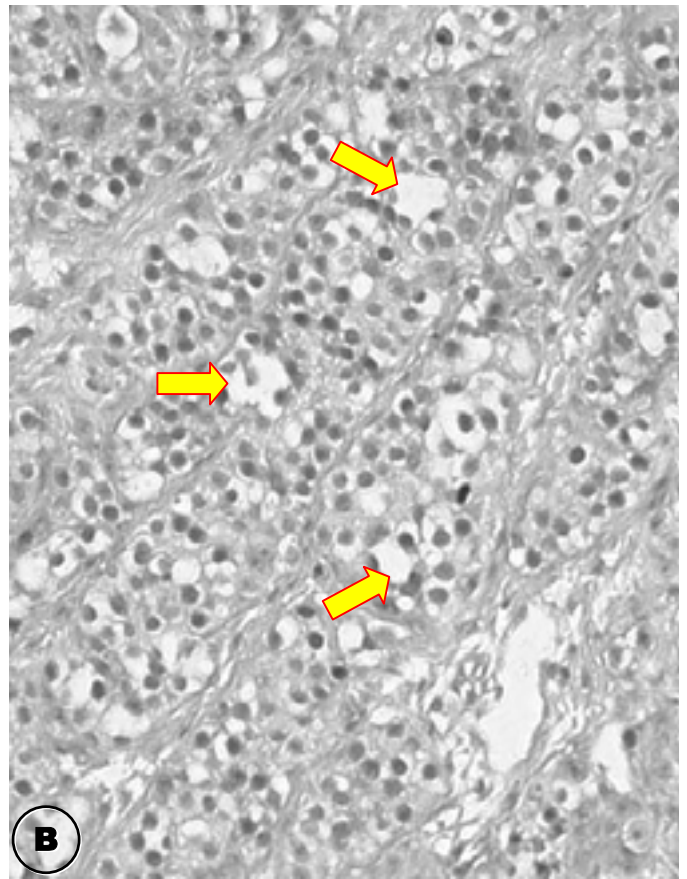
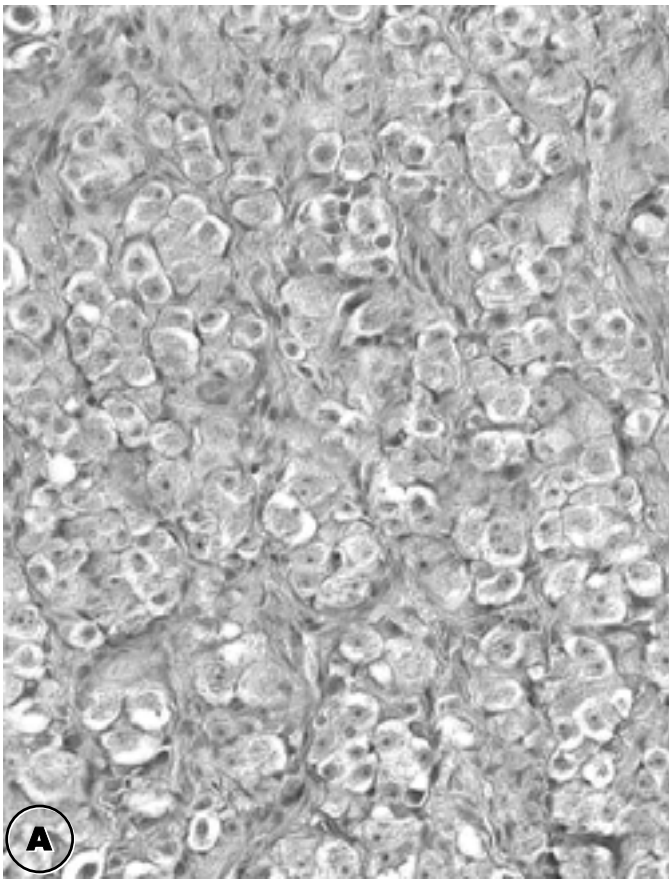


Figure 14 - Coupes de testicules de turbot. **A** : Témoin ; **B** : Pétrole brut de la Mer du Nord ; **C** : Nonylphénols ; **D** : Mélange Pétrole brut/ Nonylphénols. (Coupes paraffine 3 μ m ; hématoxyline-éosine-safran)

Conclusion

Les études de toxicité au niveau hépatique, sont actuellement principalement représentées par des recherches en enzymologie. Les analyses histocytopathologiques, nombreuses avant les années 1990, étaient généralement des études isolées, sans relation avec une approche fonctionnelle des perturbations observées. De la même façon, les études biochimiques et/ou physiologiques, y compris les plus récentes, sont généralement conduites indépendamment de toute approche structurale. Pourtant, la combinaison de ces deux types d'approches (fonctionnelles et structurale) permet d'appréhender les perturbations observées dans un cadre plus global et d'améliorer l'interprétation en apportant des éléments d'explication que chacune des techniques employées seule n'aurait pu amener. Ainsi, seule l'analyse histologique des gonades peut confirmer avec certitude des perturbations du cycle de reproduction que les analyses biochimiques permettent seulement de soupçonner.

Dans notre étude, Les analyses biochimiques et enzymologiques ont montré une perturbation du système endocrinien en relation avec des lésions structurales gonadiques chez le turbot et des perturbations du cycle de reproduction chez la moule.

L'analyse structurale peut être abordée à deux niveaux d'étude différents et complémentaires : à l'échelle de la microscopie optique et celle de la microscopie électronique. L'histopathologie permet de mettre en évidence l'étendu, la localisation et la nature des altérations induites ; cependant seules des perturbations ou des lésions relativement tardives et /ou importantes sont alors révélées. Une meilleure compréhension de l'impact biologique des polluants sur un organe nécessite une analyse ultrastructurale susceptible de caractériser précocement les processus cellulaires. C'est le cas présent dans notre étude histopathologique sur l'intestin.

B- La moule

Les résultats sont présentés sous forme de deux publications.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Marine Environmental Research 58 (2004) 437–441

MARINE
ENVIRONMENTAL
RESEARCH

www.elsevier.com/locate/marenvrev

Biochemical and histological responses in mussel (*Mytilus edulis*) exposed to North Sea oil and to a mixture of North Sea oil and alkylphenols

N. Aarab ^{a,*}, C. Minier ^b, S. Lemaire ^a, E. Unruh ^c,
P.-D. Hansen ^c, B.K. Larsen ^d, O.-K. Andersen ^d,
J.-F. Narbonne ^a

^a *Environmental and Toxicological Chemistry LPTC, UMR CNRS 5472, University of Bordeaux I, Talence, France*

^b *Laboratory of Ecotoxicology LEMA, University of Le Havre, BP 540, 76058 Le Havre, France*

^c *Technische Universität Berlin, FB7-Institute for Ecological Research and Technology, Department of Ecotoxicology, Berlin, Germany*

^d *RF-Rogaland Research, PO Box 2503, N-4091 Stavanger, Norway*

Abstract

Several environmental chemicals are suspected to be responsible for adverse health effects on the reproductive system in various organisms. During this work, environmentally relevant concentrations of North Sea oil were used alone or in combination with alkylphenols and additional PAH to study the effect on vitellogenin-like protein expression and gonadal development in mussels. North Sea oil (0.5 ppm) induced the expression of phospho-proteins in both sexes indicating that some compounds are oestrogen-mimics. This induction was not seen in samples dosed with the mixture but signs of toxic effects were observed in the gonads. Indeed, numerous degenerating ovarian follicles in females and foci, similar to vertebrate melanomacrophage centres, were observed in testes.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Mytilus edulis*; Vitellogenin-like protein; Histopathology; Endocrine disruption

* Corresponding author. Tel: +33-5-40-00-24-56; fax: +33-5-40-00-87-19.

E-mail address: n.aarab@lptc.u-bordeaux1.fr (N. Aarab).

Awareness of endocrine disruption has increased in the past few years both in the scientific community and in the general public as a large number of reports are now pointing out that adverse health effects could arise in a large variety of invertebrates species (reviewed in WHO, 2002). However, evidence for endocrine mechanisms is still scarce. To provide information on endocrine-mediated effects the use of biomarkers in conjunction with in vitro exposure experiments could be of important value if relevant endpoints are found. The latter problem is crucial in the invertebrates species for which little is known about their endocrine system. Nevertheless, detection of vitelogenin-like proteins is a promising marker (Blaise, Gagné, Pellerin, & Hansen, 1999; Campbell & Illenye, 1980) and histology also provided interesting mechanistic data (Wester, van der Ven, Vethaak, Grinwis, & Vos, 2002).

In this study, blue mussels (*Mytilus edulis*), collected in a pristine site (Førlandfjorden) in Norway were exposed to 0.5 ppm North Sea oil (NSO), with or without an additional mixture of 0.1 ppm alkylphenols and 0.1 ppm extra PAH or to the carrier alone (2 ppb acetone) for three weeks in a continuous flow-through system. Mantle was dissected out from 20 individuals (10 males, 10 females) from each group and divided into two tubes. One part was frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. Another part was fixed in 4% buffered formalin, and further processed for routine histology with staining using eosin, hematoxylin and safran. The levels of vitellin in gonads were evaluated by an indirect alkali-labile phosphate method (Blaise et al., 1999) with some modifications. Gonads were thawed on ice, homogenized in 25 mM tris buffer pH 7.5 and centrifuged at 10,000g for 10 min at 2°C . The supernatant was carefully removed, mixed with an equal volume of *t*-butylmethylether, vortexed for 30 min and centrifuged at 10,000g for 5 min. The organic phase was carefully collected and the aqueous phase was submitted to a second similar extraction step. Both organic phases were then mixed, dissolved in 0.5ml of NaOH (1 mol l^{-1}) and incubated at 95°C for 30 min. Levels of alkali-labile phosphate were measured spectrophotometrically at 880 nm using Molybdenum Blue with potassium hydrogen phosphate as standard.

Fig. 1 shows histological sections of the mussels' gonads. In female exposed to North Sea oil, ovarian follicles are larger and more numerous than in control, leaving smaller areas of connective tissue and thus suggesting that a more precocious development arose when compared to control (Fig. 1(a) and (b)). When exposed to North Sea oil combined with alkylphenols and PAHs, the mussels gonads displayed numerous degenerating ovarian follicles indicative of dramatic toxic effect of the mixture on the organ. The connective tissue was then very loose and contained numerous haemocytes in the periphery of the follicles (Fig. 1(c)).

The mantle from male mussels exposed to North Sea oil alone or in combination with alkylphenols and PAHs presented similar aspect to control (Fig. 1(d)–(f)). The spermatid follicles were numerous and largely filled with spermatids and spermatozoa indicating that spermatogenesis occurred normally. However, some of the follicles from the NSO exposed individuals showed ejaculating patterns with sperm filling ducts around the follicles (Fig. 1(e)). In some cases, accumulation of haemocytes were seen in contact with follicles, resembling vertebrate

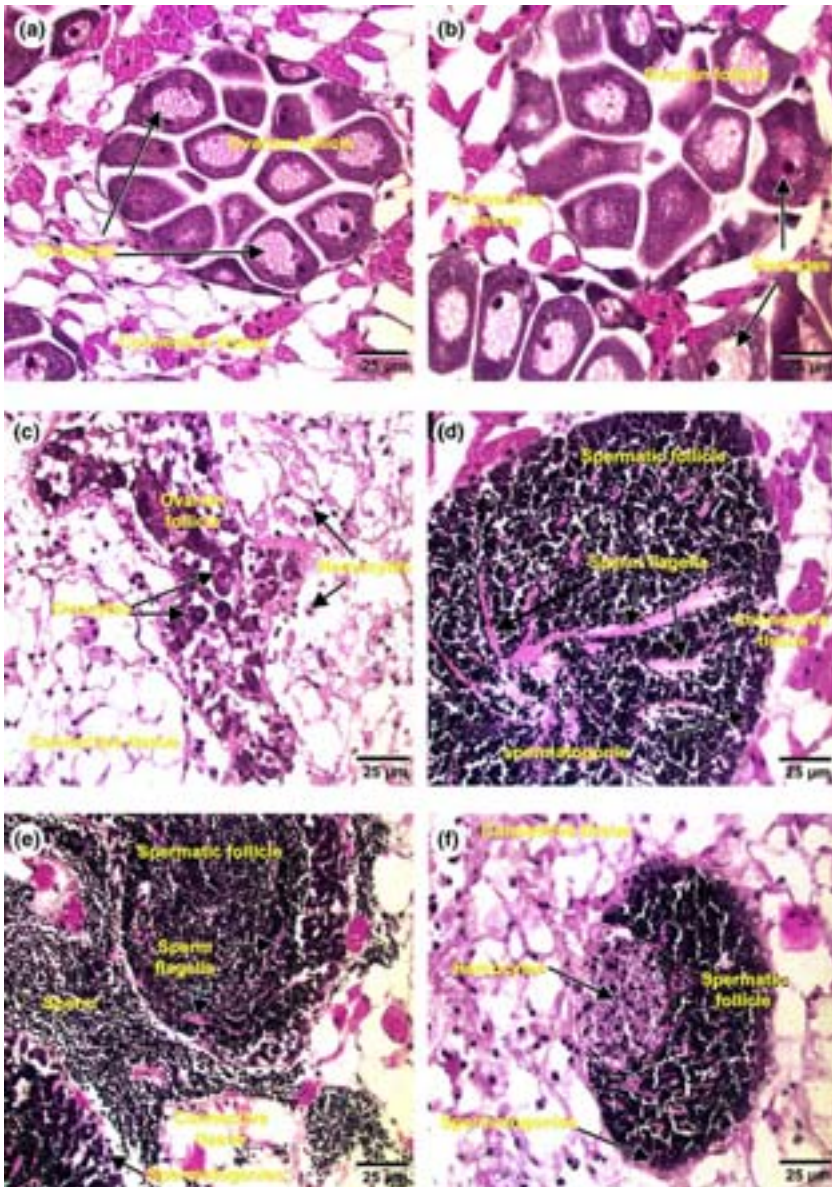


Fig. 1. Histological sections of mantle from female and male mussels. (a) Mantle section from control female mussel. (b) Mantle section from female mussel exposed to North Sea oil. (c) Mantle section from female mussel exposed to North Sea oil, alkylphenol and PAHs. (d) Mantle section from control male mussel. (e) Mantle section from male mussel exposed to North Sea oil. (f) Mantle section from male mussel exposed to North Sea oil, alkylphenol and PAHs.

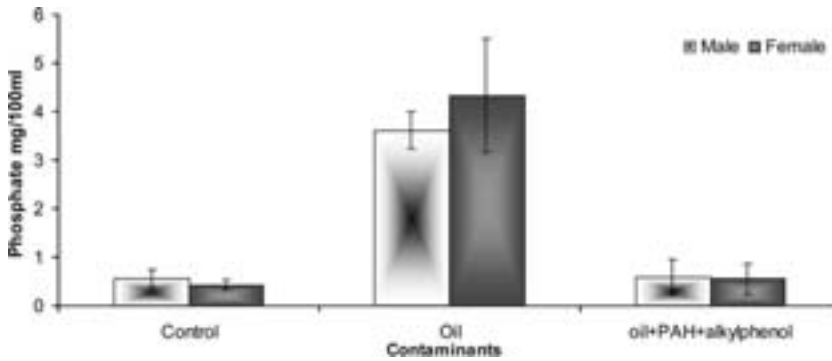


Fig. 2. Levels of gonad VTG-like in mussels exposed to different mixtures of compounds. Bars represent standard deviation.

melanomacrophage centres in mussel exposed to mixture (Fig. 1(f)) and may thus reflect adverse effect.

Total phosphoproteins expressed in the gonads, which arguably correspond to mussel vitellogenin-like proteins, were assessed within the same individuals. For both sexes, very low levels were found in control animals or in mussels exposed to the mixture (Fig. 2). On the contrary, phosphoproteins amounts were significantly (3–7 times) higher in males and females exposed to NSO alone than in NSO/alkylphenol/PAH mixture. This rise in vitellogenin-like proteins could result from the binding of one or several oestrogen receptor agonists within the NSO, which subsequently lead to protein expression. But as NSO was also present in the mixture at the same concentration, it would then mean that other compounds might have acted as antagonists in this exposed mussel group. Another possibility is that the combination and concentrations of the compounds in the mixture lead to toxic effects that subsequently prevent the animals to produce the phosphoproteins. This latter hypothesis is supported by the histological analysis of the gonads.

This preliminary study indicates that North Sea oil may elicit an endocrine disruptive effect in mussels and that in combination with other pollutant compounds such as alkylphenols at environmentally relevant concentrations may produce pathological effects.

Acknowledgements

This work was supported by the European Project BEEP (Biological Effects of Environmental Pollution in marine coastal ecosystems). The authors thank all the group of toxicologists from Akvamiljøin at the Rogaland Research Institute, Stavanger, Norway, for the organisation of the exposure experiment.

References

- Blaise, C., Gagné, F., Pellerin, J., & Hansen, P.-D. (1999). *Environmental Toxicology*, 14, 455–465.
- Campbell, C. M., & Illenye, S. (1980). *Biology of Reproduction*, 22, 605–617.
- Wester, P. W., van der Ven, L. T. M., Vethaak, A. D., Grinwis, G. C. M., & Vos, J. G. (2002). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 11, 289–295.
- WHO. (2002). Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. IPCS. T. Damstra, S. Barlow, A. Bergman, R. Kavlock, & G. Van der Kraak (Eds.), WHO/PCS/EDC/02.2. 180pp.

Biochemical and histological responses in mussel (*Mytilus edulis*) exposed to Bisphenol A, Diallylphthalate and Tetrabromodiphenyl ether

N. Aarab^{1*}, S. Lemaire-Gony¹, E. Unruh², P.D. Hansen², B.K. Larsen³, O.K. Andersen³, J.F. Narbonne¹.

¹ Environmental and Toxicological Chemistry LPTC, UMR CNRS 5472, University of Bordeaux I, Talence. France.

² Technische Universität Berlin, FB7-Institute for Ecological Research and Technology, Department of Ecotoxicology. Germany.

³ RF-Rogaland Research, PO Box 2503, N-4091, Stavanger, Norway.

* Corresponding author. Tel: +33 5 40 00 24 56 ; fax: + 33 5 40 00 87 19
E-mail address: n.aarab@lptc.u-bordeaux1.fr

Key words : *Mytilus edulis*, Vitellogenin-like protein, Histopathology, Endocrine disruption.

Abstract

Environmental pollutants with hormonal activity including bisphenol, diallyl phtalate and tetrabromodiphenyl ether, have the potential to alter gonadal development and reproduction in aquatic wildlife. Little is known about the biological impact of environmentally relevant concentrations in mussels. To investigate some aspects of their potential oestrogenic action, mussels were continuously exposed during 3 weeks. Gonadal development and vitellogenin like protein levels were examined. Bisphenol (50 µg/L) induced the expression of phospho-proteins in both sexes indicating that some compounds are oestrogenic –mimics. No induction was seen in other conditions. Moreover severe damaging effects on ovarian follicles and ovocytes were observed.

Introduction

Reproductive hormone-receptor systems appear to be particularly vulnerable. Indeed, changes in sperm counts, genital tract malformations, infertility and an increased frequency of mammary, prostate and testicular tumours have all been reported (Sharpe and Skakkebaek, 1993; Colborn *et al.* 1996). Hormonal disturbances in wildlife include sex changes in riverine fish and marine snails, reproductive failure in birds, and abnormalities in the reproductive organs of alligators and polar bears. EPA listed several compounds capable of disrupting the endocrine system of animals, including fish, wildlife, and humans such as herbicides, insecticides, fungicides, persistent and non-persistent, new and old, from DDT to tributyltin (TBT), industrial chemicals such as polychlorinated biphenyls (PCBs), dioxins, and polyaromatic hydrocarbons (PAHs). In this study, we have screened various compounds for their effects in invertebrates namely in mussels. Mussels are particularly at risk to chemicals found in the aquatic environment because they are stationary, endobentic, and filter relatively high volume of water, including suspended particles.

Bisphenol A (BPA) is a chemical building block that is used primarily to make polycarbonate plastic and epoxy resins. Over four decades of extensive safety research on BPA shows that consumer products made with BPA are safe for their intended uses and pose no known risks to human health and animals. Polycarbonate plastic is a lightweight, high-performance plastic that possesses a unique balance of toughness, optical clarity, high heat resistance and excellent electrical resistance. Because of these

attributes, polycarbonate is used in a wide variety of common products including digital media (e.g., CDs, DVDs), electrical and electronic equipment, automobiles, sports safety equipment, reusable food and drink containers, and many other products. Although in 1936 Doods and Lawson noted oestrogenic activity of bisphenol A (4-4'-isopropylidenediphenol) (Doods and Lawson., 1936), it is only in the last few years that this compound has received extensive attention. Prenatal exposure of rodents to low doses of BPA, equivalent to those to which humans are exposed, alters the development of the reproductive organs of male and female offspring (Markey et al., 2000; Markey *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2001; Rubin *et al.*, 2001; Sheehan, 2000)

Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) are used as flame retardants, mainly in plastic materials. They are found, for example, in computers and cable insulators. Analysis of sediment and sewage sludge has demonstrated that the levels of PBDEs seem to increase in the environment. Increasing levels of pentabromodiphenyl ether and tetrabromodiphenyl ether have also been observed in Swedish freshwater pike and guillemot egg (Sellstrom *et al.*; 1993). For the present study, we have chosen 2,2', 4,4' tetrabromodiphenyl ether.

Phthalate are plasticizers used in the production of polyvinyl chloride to make it flexible and workable and, to a lesser degree, in paints, lacquers and cosmetics (Cosmetic Ingredient Review, 1992; Harris *et al.*, 1997). Phthalates are ubiquitous environmental contaminants. They are released into the environment during manufacturing processes and through elimination in widespread waters. They have been detected in sediment, water and air (Fatoki and Vernon, 1990). Some phthalates are suspected to disturb the endocrine system, specially by mimicking oestrogens (Harris *et al.* 1997). N-butyl benzyl phthalate (BBP) has oestrogenic effects *in vitro* but not *in vivo*. In the present work, we investigated the effects of diallyl phthalate.

Materials and methods

Blue mussels (*Mytilus edilus*), collected in a pristine site (Forlandfjorden) in Norway were exposed to 50 µg/L of diallyl phthalate (mixture of three isomers), 50 µg/L

of bisphenol A or 1 µg/L of tetrabromodiphenyl ether for 3 weeks in a continuous flow-through system. Acetone was the carrier for all three compounds, and the acetone itself was be 50,000 times diluted in the tanks, which is well bellow the NOEC level for acetone.

After a three week-exposure, mussels were dissected. In mussels, the gonadal tissue is spread between the visceral mass and the mantle (Lubet, 1959). We chose to sample the mussel mantle to investigate gonadal damage. The mantle was removed from 20 individuals (10 males and 10 females) from each group and divided into two samples. The first one was frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. The other one was fixed in 4% buffered formalin, and further processed for routine histology. The 3 µm-thick paraffin sections were stained using eosin, hematoxylin and saffron.

Levels of vitellogenin-like proteins were determined in mantle tissue by indirect method alkali labile phosphate assay (Gagné *et al.*, 2001) with some modification. Mantle tissues were homogenised with a teflon pestle in 25 mM tris buffer at pH 7.5. The homogenate was then centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4°C. The supernatant was carefully removed. High molecular weight proteins were precipitated in 50% t-butylmethyl ether. After strong agitation for 10 min, the protein pellet was obtained by centrifuging at 10,000g for 5 min at 2°C. The results pellet was reconstitute in 500 µL of NAOH and heated at 95°C for 30 min. Levels of alkali labile phasphate were measured spectrophotometrically at 880 nm using Molybdenum Blue potassium hydrogen phosphate as standard.

Results and discussion

Histological sections of control mussel mantle (Fig 1) displayed numerous ovarian follicles filled with mature ovocytes, associated to reduced mantle connective tissue, indicating late pre-spawning stage. When exposed to bisphenol A mussels showed two different patterns. In 50% of mantle sections, the ovarian follicles appeared reduced in size and empty of ovocytes. The mantle displayed mainly connective tissue in relation with the decrease in size and number of the ovarian follicles (Fig 2), indicating post-spawning stage. On the other hand, the other 50% of bisphenol-exposed mussels had ovarian follicles filled with atretic ovocytes. Mantle sections of diallyl

phthalate-exposed mussels exhibited normal ovarian follicles, with mature oocytes. However, follicles were smaller and less numerous, and the mantle connective tissue occupied larger areas than in control mussels (Fig 3). In tetrabromodiphenol-exposed mussels, the ovarian follicles were mainly filled with atretic oocytes, although some rare normal follicles could be observed (Fig 4).

The levels of phosphoproteins expressed in the mantle gonadal tissue, which correspond to mussel vitellogenin-like proteins, were significantly increased in mussels exposed to bisphenol A. The increase was observed in both sexes. (Fig.5). On the contrary, a significant decrease in vitellogenin like protein levels was observed in mussels exposed to diallyl phthalate and tetrabromodiphenyl ether.

Although a decrease in vitellogenin like protein levels could have been expected from the histological results (post-spawning or degeneration of gonadal tissue) in bisphenol A-exposed mussels, the contrary was observed. However, in this case, the increase in vitellogenin like protein levels appears to be linked to a general increase in phospho-proteins as the increase was observed in male as well as in females although the difference between male and female levels remained the same in bisphenol-exposed ($\Delta = 0.94$) and control ($\Delta = 0.93$) mussels. It is likely that the vitellogenin like protein level is little affected by bisphenol A.

The decrease in vitellogenin like protein with diallyl phthalate treatment could result from the reduction in the number of normal oocytes in the mantle gonadal tissue compared to control, as only small follicles and atretic oocytes were present in diallyl phthalate-exposed mussels. In the same way, the presence of numerous atretic oocytes in tetrabromodiphenyl ether exposed mussels could account for the significant decrease observed in vitellogenin like protein levels.

Aknowledgments

The authors would like to thank all the groupe of toxicologists from Akvamiljø at the Rogaland Research Institute, Stavanger, Norway, for the organisation of the exposure experiment. The authors wishes to thank also Pr Jan Adrianus Veenstra from the Laboratoire des Neurosciences Cognitives - Neuroendocrinologie des Insectes

(University Bordeaux 1) for free access to his photomicroscope and the groupe of hopital Monod in Le Havre.

Reference

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. *Environ. Toxicol.* 14, 455-465.

Colborn, T. Smolen, M. J. (1996). Epidemiological analysis of persistent organochlorine contaminants in cetaceans in *Rev Environmental Contamination Toxicology*. 146, 91-172

Fatoki, O.S, and Vernon, F. (1990). Phthalate esters in rivers of the Greater Manchester area, U.K. *Science. Total Environmental*. 95, 227-232.

Gagné, F. B., C.; Lachance, B.; Sunahara, G.I.; Sabik, H. (2001). Evidence of coprostanol estrogenicity to the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Environmental Pollution.*, 115, 97-106.

Harris, C. A., Henttu, P., Paker, M. G., and Sumpter, J.P. (1997). The estrogenic activity of phthalate esters in vitro. *Environmental Health Perspective*. 105, 802-810.

Lubet, P .(1959). Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les Mytilidés et les Pectinidés. Thèse de la Faculté des Sciences de l'Université de Paris. N°3377.

Nylund, K., Asplund, L., Jansson, B., Jonsson, P., Litzen, K. and Sellstrom. U. (1992). Analysis of some polyhalo-genated organic pollutants in sediment and sewage sludge. *Chemosphere* 24, 1721-1730.

Ramos, I. N., May, M., and Ramos, K. S.,2001, Environmental health training of promotoras in colonias along the Texas-Mexico border. *American Journal of Public Health*, 91, 568-70

Sellstrom, U., Andersson, R., Asplund, L., Jansson, B., Jonsson, P., Litzen, K., Nylund, K., Uvemo, U.-B. and Wideqvist, U. (1990). Anthropogenic brominated aromatics in the Swedish environment. In: L. Freij (Ed.), Proceedings of the Workshop on Brominated Aromatic Flame Retardants. Skokloster, Sweden, 24-26 October. *National Chemicals Inspectorate (KEMI). Solna*. 73-78.

Sellstrom., U., Jansson. B., Kirkegaard, A. and De Wit, C. (1993). Polybrominated diphenyl ethers (PBDE) in biological samples from the Swedish environment. *Chemosphere* 26, 1703-1718.

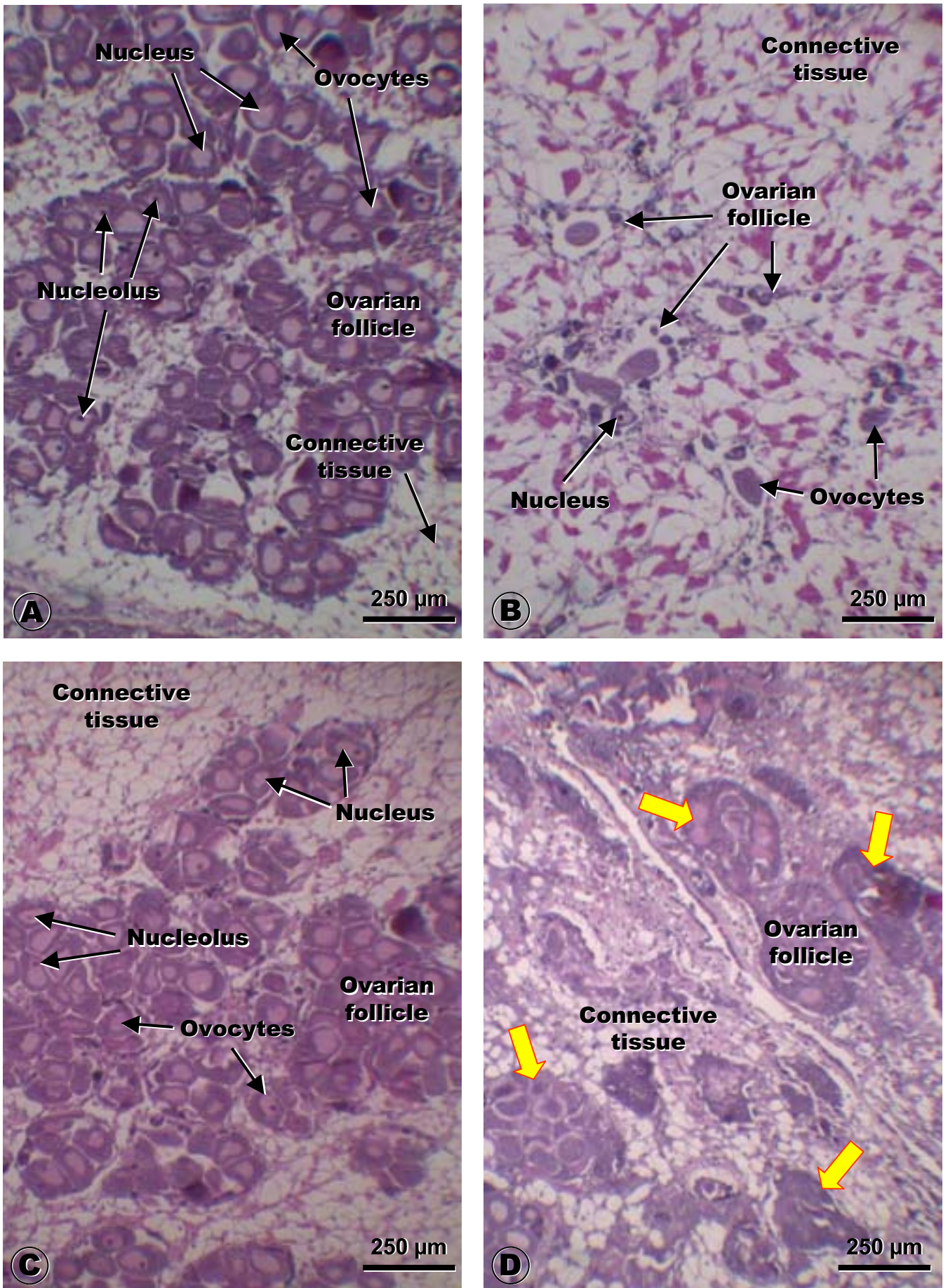


Figure 1 - Female mussel *Mytilus edulis* mantle section. **A** : control ; **B** : exposed to bisphenol A ; **C** : exposed to diallylphthalate ; **D** : exposed to tetrabromodiphenyl ether. Arrows indicate atretic ovocytes. (Paraffin sections, 3 µm-thick, hematoxylin-eosin-saffron)

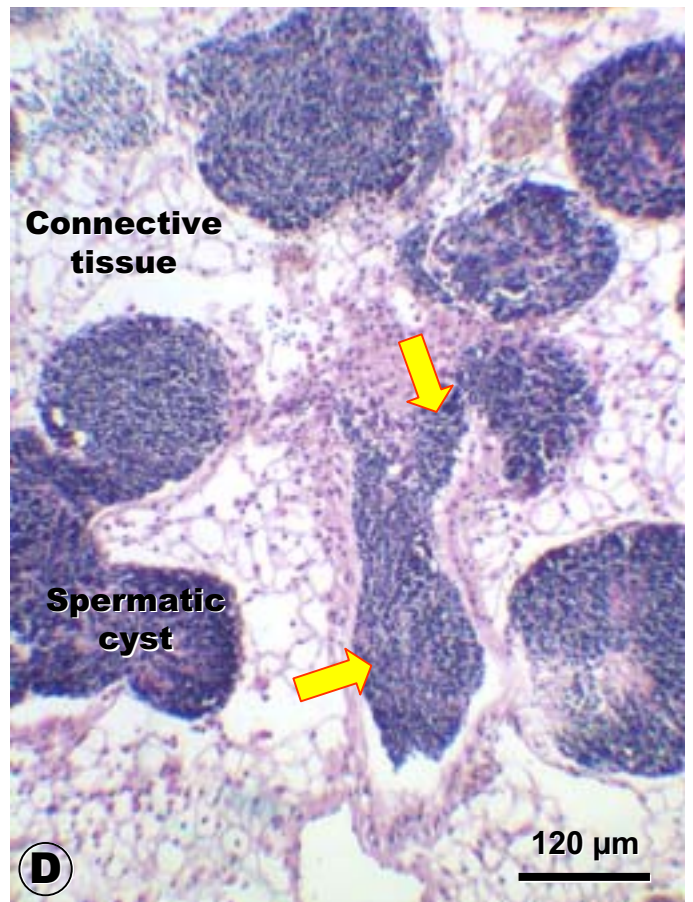
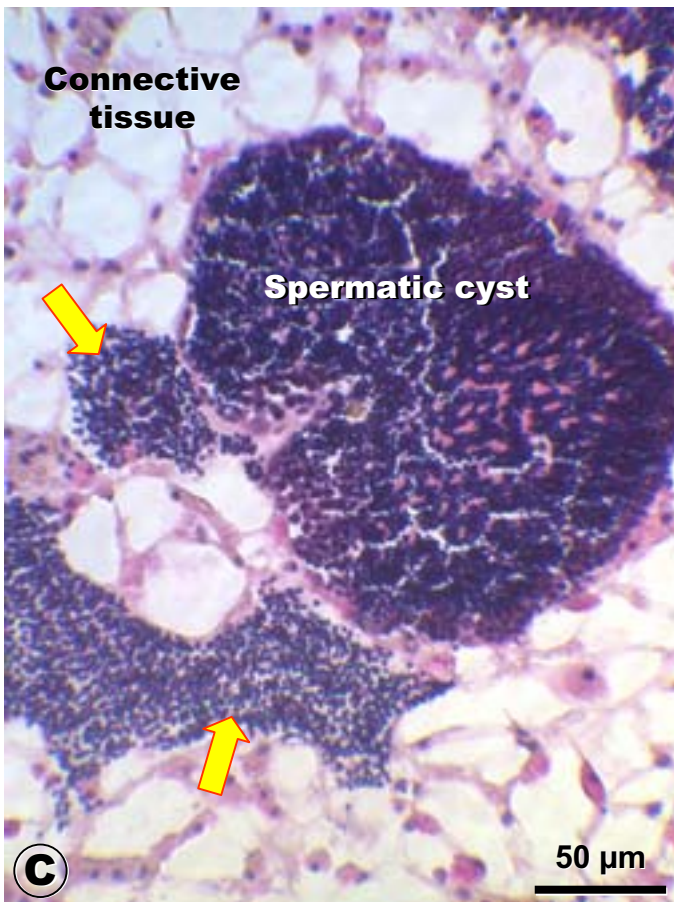
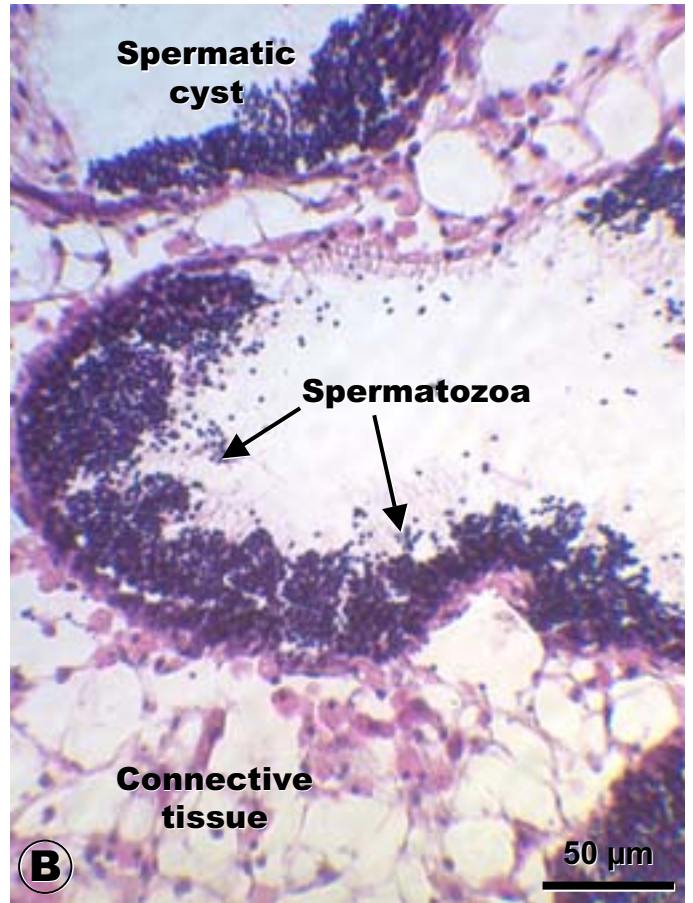
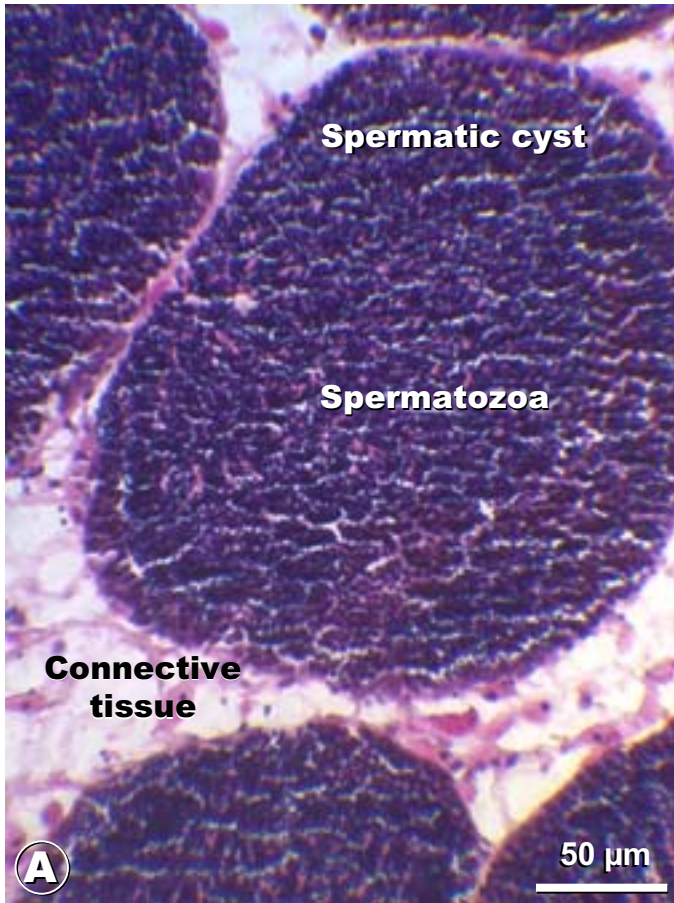


Figure 2 - Male mussel *Mytilus edulis* mantle section. **A** : control ; **B** : exposed to bisphenol A ; **C** : exposed to diallylphthalate ; **D** : exposed to tetrabromodiphenyl ether. Arrows indicate gonadal ducts filled with sperm. (Paraffin sections, 3 μm -thick, hematoxylin-eosin-saffran)

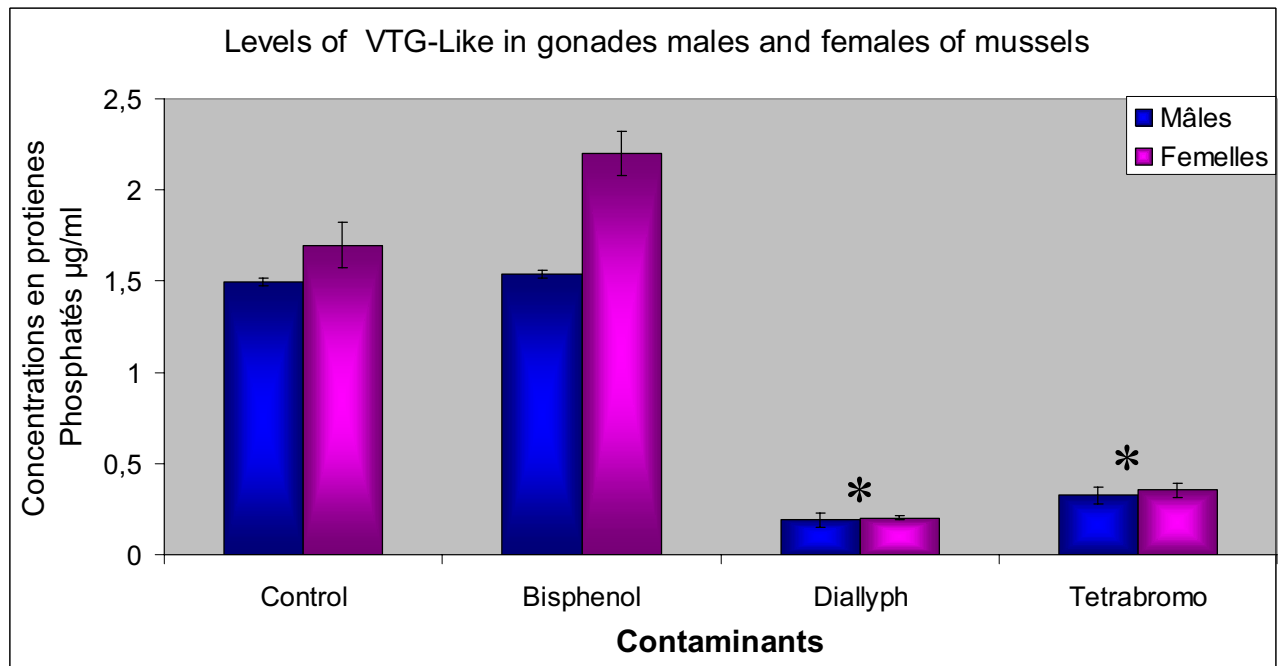


Figure 3: Levels of gonad VTG-Like in mussels exposed to different mixtures of compounds.

Bars represent standard deviation

**CHAPITRE III: ETUDE *IN VITRO* DES
MÉTABOLITES DE LA TESTOSTÉRONNE**

Dans ce chapitre nous aborderons d'une part quelques généralités sur le métabolisme endogène du P450 et plus précisément celui de la testostérone, d'autre part nous présenterons la mise au point d'un protocole analytique simple et sensible permettant l'identification des métabolites de la testostérone en HPLC chez des organismes aquatiques. Notre choix s'est porté sur la truite-arc-en ciel et les bivalves *C. fluminea* et *M. galloprovincialis* qui sont des espèces sentinelles de pollution. La technique a été mise au point en premier chez les vertébrés (truite), puis a été l'extrapolée aux invertébrés. Le but général de ce travail a été d'optimiser une technique rapide, simple pour la séparation des hydroxytestosterones chez ces organismes aquatiques afin de l'utiliser comme biomarqueur des perturbateurs endocriniens chez des espèces aquatiques issues du milieu naturel ou de mésocosmes.

1)- Métabolisme endogène catalysé par les cytochromes P450

a) Exemple des stéroïdes

Les cytochromes P-450 jouent un rôle dans le métabolisme des composés exogènes mais aussi des composés endogènes. Dans le cas des xénobiotiques, ce métabolisme conduit soit à la formation de composés moins actifs et plus facilement excrétés par l'organisme, soit à une activation en composés mutagènes.

Dans le cas du métabolisme endogène, plusieurs cytochromes P-450 sont impliqués à la fois dans la synthèse et dans le catabolisme de molécules essentielles à la fonction cellulaire (Figure 1). De plus, il a été avancé que les cytochromes P-450 ont un rôle important dans le contrôle de l'homéostasie d'effecteurs endogènes de la croissance et de la différenciation cellulaire (Nebert & Nelson, 1991).

Les stéroïdes font partie des produits du métabolisme endogène catalysés par les isoformes du cytochrome P-450.

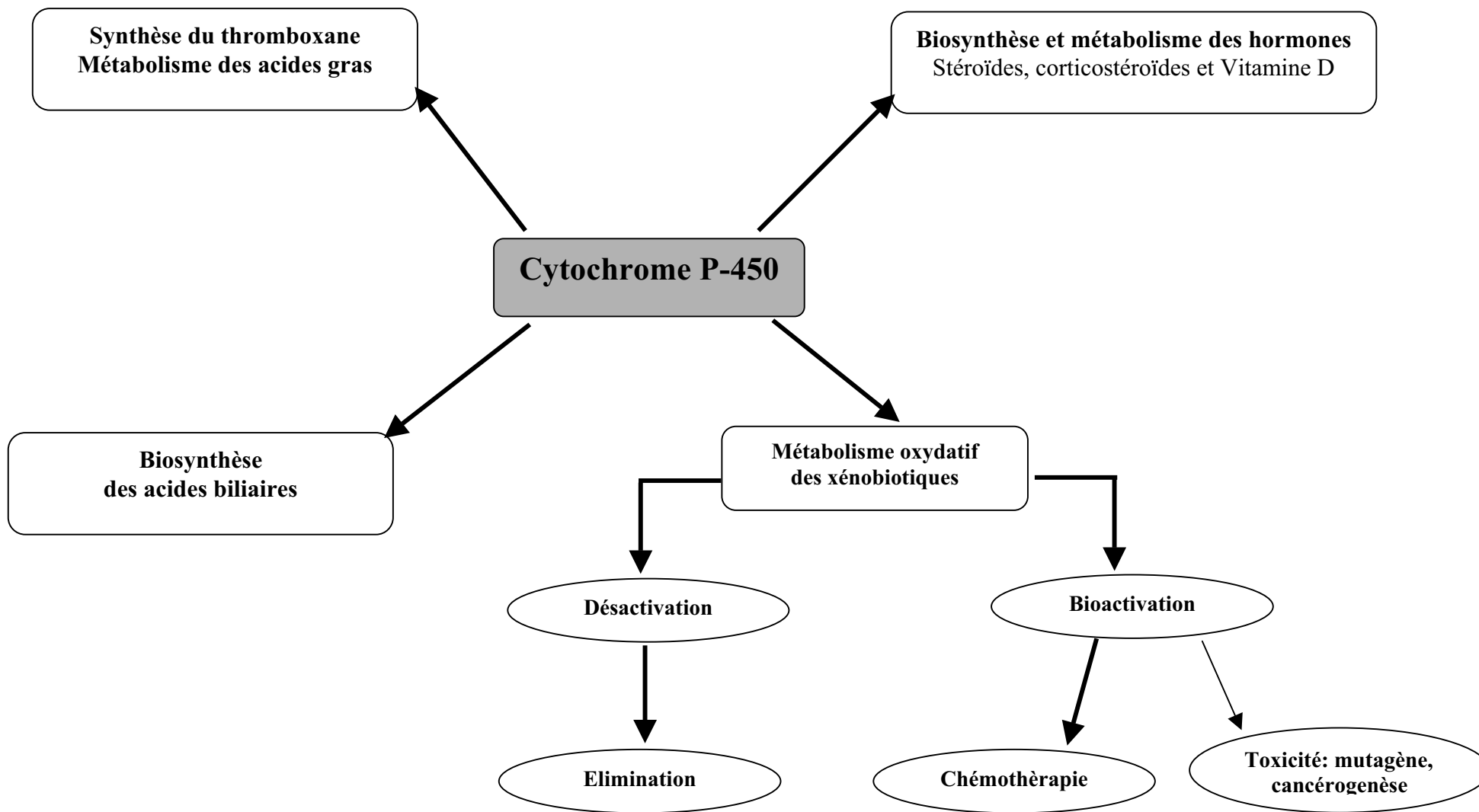


Figure 1 : Principaux rôles des cytochromes P450 dans le métabolisme des substances endogènes et des xénobiotiques (d'après Wolf, 1986)

b) Les stéroïdes et la testostérone

Le métabolisme des stéroïdes paraît être la fonction initiale des cytochromes P-450. Les différentes isoformes du cytochrome P-450 actuellement caractérisées auraient divergé des formes "ancestrales". Les stéroïdes endogènes servent de substrats naturels aux cytochromes P-450. Cette idée est fondée sur le fait que le K_m mesuré pour les stéroïdes est de l'ordre de la micromole (μM) alors qu'il est de l'ordre de la millimole (mM) pour les composés exogènes.

D'autres familles de cytochrome P-450 sont également impliquées dans le métabolisme des stéroïdes, notamment le CYP1A2 (oestrogène 2-hydroxylase) et le CYP2D qui catalysent la 16α -hydroxylation de la testostérone. Les cytochromes P-450 catalysent une partie des hydroxylations conduisant à la synthèse des hormones mais aussi leur désactivation, représentée entre autre par l'activité 5α -réductase. Certains métabolites hydroxylés de la testostérone sont également substrats de cette dernière réaction. (pour revue Jansen & De Fluiter, 1992).

L'exposition de l'organisme à des xénobiotiques perturbe le métabolisme endogène des stéroïdes *via* la suppression de certains P-450 constitutifs, ou l'induction d'isoformes actives.

2)- La testostérone : substrat modèle des cytochromes P-450

Les régio- et stéréospécificités de l'hydroxylation du noyau stéroïde par les cytochromes P-450 rendent également très intéressante l'étude qualitative et quantitative des métabolites des stéroïdes non seulement pour les endocrinologues mais aussi pour les toxicologues.

Des études réalisées avec des cytochromes P-450 hépatiques purifiés de rat et d'Homme ont établi que les cytochromes individuels présentaient un profil métabolique unique de la testostérone (Wood *et al.*, 1983; Waxman *et al.*, 1991, Jansen & De Fluiter, 1992). Ainsi, on peut assigner l'hydroxylation en un point du cycle de la testostérone à quelques cytochromes P-450 voire à un seul (figure). Cependant, l'interprétation d'un tel profil est rendue difficile par le fait qu'une isoforme du cytochrome P-450 peut produire plusieurs métabolites hydroxylés de stéroïdes, mais aussi qu'un métabolite donné peut être produit par plusieurs cytochromes P-450. Toutefois, dans le cas de la testostérone, de nombreuses d'études ont permis

d'établir les relations de « spécificités » décrites dans le tableau 12. Ainsi, chez le rat, l'hydroxylation en position 7 α - et 16 β - de la testostérone est respectivement spécifique des isozymes CYP2A1 et CYP2B1. L'isozyme CYP3A1 produit 4 métabolites hydroxylés de la testostérone (2 β , 6 β , 15 β et 18-hydroxytestostérone) (Figure 2 et 3). Toutefois, l'hydroxylation en position 6 β représente 85% de l'activité hydroxylase de cette isoforme. Quant aux membres de la sous-famille 1A, bien qu'ils présentent une faible affinité à l'égard de la testostérone, on peut leur assigner une part de la production des 2 β - et 6 β -hydroxytestostérone.

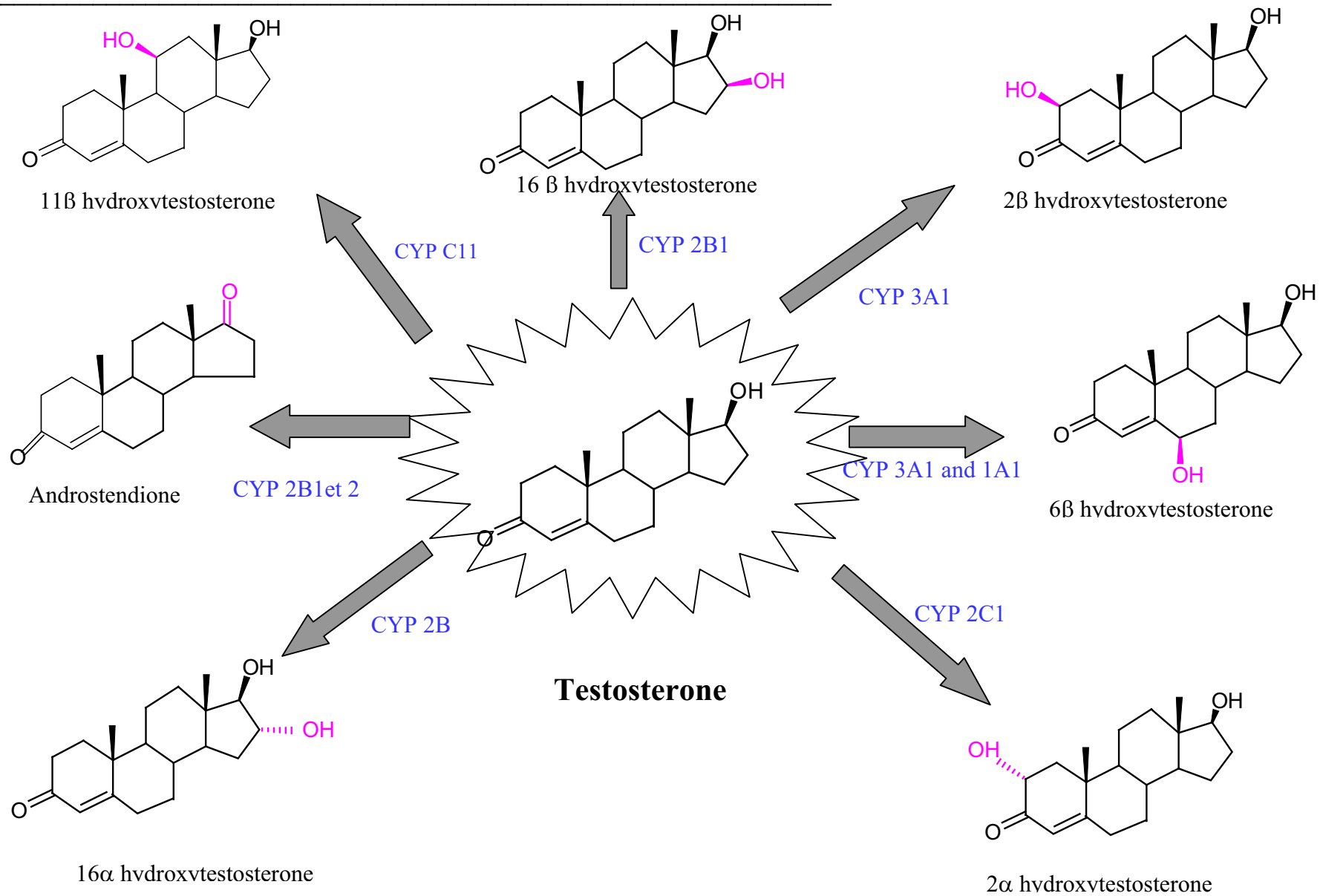


Figure 2: Les métabolites de la testostérone avec les différents cytochromes P450 impliqués dans cette métabolisation.

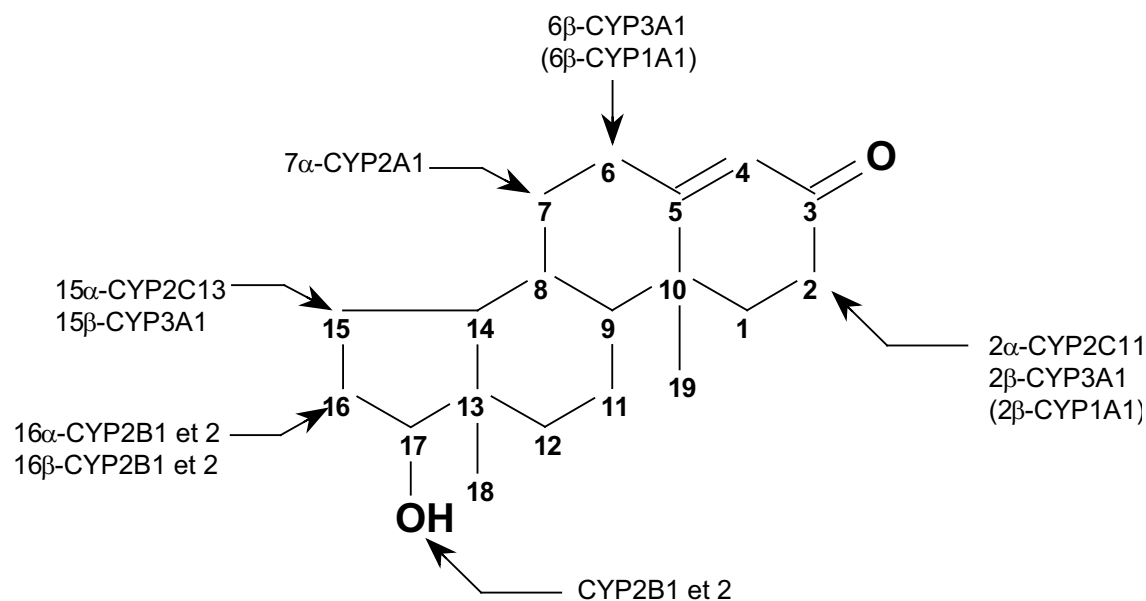


Figure 3 : Régio et stéréospécificités du métabolisme de la testostérone par différentes isoformes du cytochrome P450 ;

Matériels et méthodes

a) Les animaux

- *Corbicula fluminea* est un mollusque qui possède plusieurs caractéristiques lui permettant d'être considérée comme une espèce sentinelle potentielle.

- Son mode de vie à l'interface sédiment-eau lui permet d'être en contact avec ces deux compartiments. Il doit filtrer de grandes quantités d'eau pour remplir ses besoins respiratoires et nutritionnels mais peut également se nourrir de particules provenant du sédiment. Il est ainsi susceptible d'accumuler des contaminants présents dans la colonne d'eau et les sédiments.

- Il est largement répandu aux Etats-Unis depuis son introduction dans les années 30 et constitue dorénavant un composant majeur des communautés benthiques. Sa présence en Europe, et notamment en France est également devenue courante. Une croissance rapide, une durée de vie relativement longue (3 ans) et un mode de reproduction particulièrement efficace lui permet d'atteindre rapidement de fortes densités. Il est donc relativement aisé de trouver un ou plusieurs site(s) peuplé(s) par *C. fluminea* et de prélever un nombre suffisant d'animaux pour la réalisation d'études de laboratoire ou de terrain.

- **Truite-arc-en ciel** (voir le premier chapitre)

b) Méthode

La mise au point de la technique pour la détection des métabolites de la testostérone a fait l'objet d'une publication (voir l'article suivant). Des précisions complémentaires sont apportées ci-dessous.

Les métabolites hydroxylés de la testostérone peuvent être identifiés grâce à des profils obtenus par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC). L'analyse des métabolismes de la testostérone est basée sur la méthode décrite par Whalley sur laquelle nous avons apporté des modifications. Cette méthode d'analyse lourde et onéreuse nécessite l'utilisation de la testostérone marquée [^{14}C]. De plus, la radioactivité est manipulée seulement par du personnel ayant une habilitation d'usage, ce qui limite son utilisation pour des analyses de routine, et ne pourra donc pas être appliquée dans le cadre d'une recherche des biomarqueurs. Pour ces raisons, la méthode présentée dans ce travail apparaît comme une alternative à celle de Whalley (voir la comparaison dans le tableau 1 de l'article).

c) Choix de la colonne

Le choix de la colonne représente l'élément le plus important dans les techniques chromatographiques ; c'est de la colonne dont dépend la capacité et la performance du protocole pour résoudre des séparations délicates. La capacité de résolution d'une colonne dépend des caractéristiques telles que la nature de la phase stationnaire, la longueur et le diamètre interne de la colonne.

Le chromatographe utilisé pour la mise au point de cette technique est équipé de lecteur en UV et fluorimétrie. Nous avons remplacé la colonne particulaire conventionnelle par une colonne poreuse monolithique de silice, qui a l'avantage de maintenir une faible pression même soumise à un débit élevé (débit de 10 mL/min environ 100 bars) par rapport à une colonne particulaire tout en apportant une meilleure résolution. Ceci est dû à la structure biporeuse de cette colonne qui se compose de macropores (2 μm) et de mesopores (13 nm) (Figure 4). Les macropores ayant une plus grande porosité permettent de supporter des débits élevés offrant ainsi une forte résistance à l'éluant, tandis que les mesopores permettant d'augmenter la superficie.

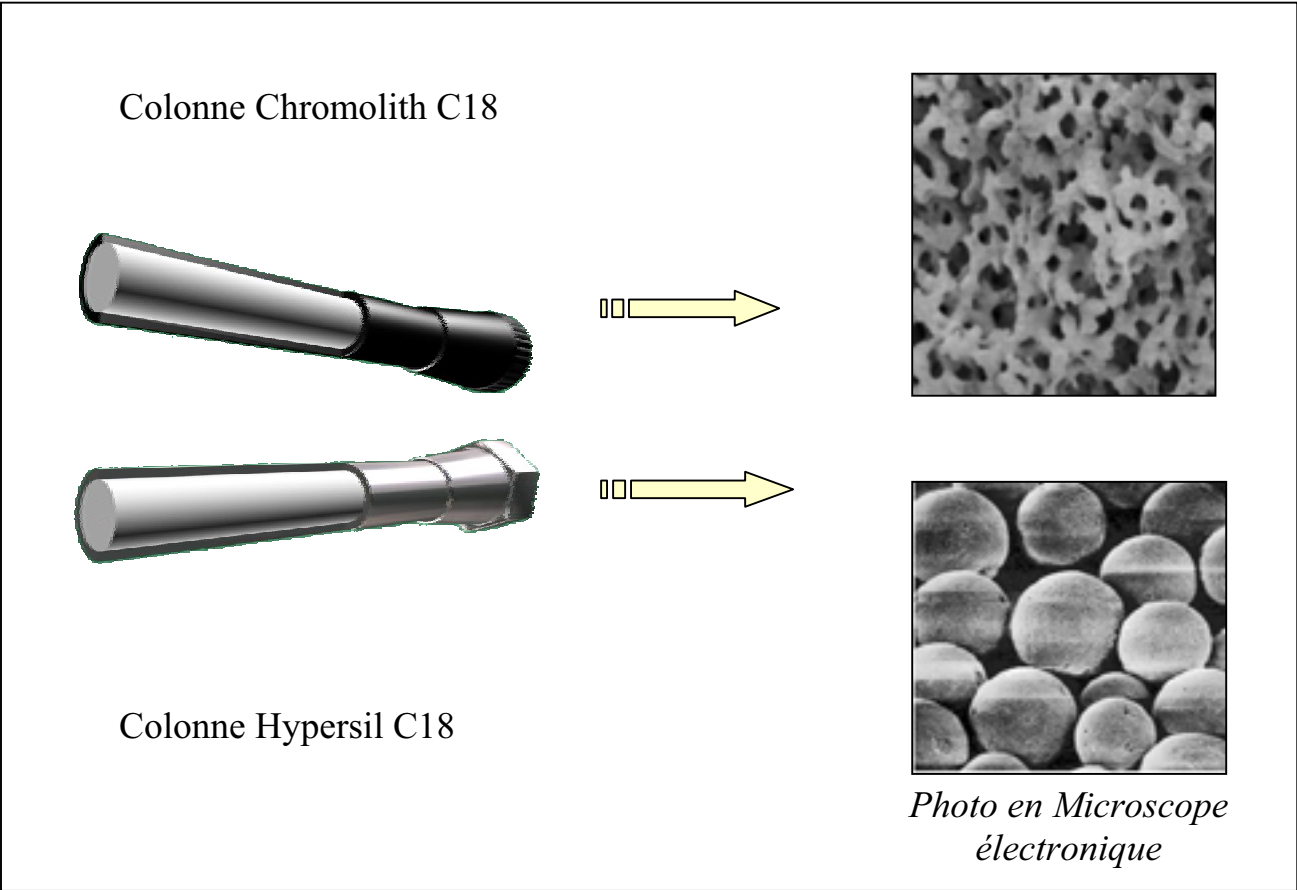


Figure 4 : différences entre la colonne particulaire et la colonne monolithique

**IN VITRO METABOLISM OF TESTOSTERONE IN AQUATIC
ORGANISMS : IMPROVEMENT OF METABOLITES DETECTION IN
FISH AND MOLLUSCS**

Nadia Aarab, Pascal Mora & Jean François Narbonne[§].

Soumise à *Analytical and Bioanalytical Chemistry*

**IN VITRO METABOLISM OF TESTOSTERONE IN
AQUATIC ORGANISMS : IMPROVEMENT OF
METABOLITES DETECTION IN FISH AND
MOLLUSCS**

Nadia Aarab, Pascal Mora & Jean François Narbonne[§].

Laboratoire de Physico-Toxicochimie des Systèmes Naturels (LPTC),
UMR 5472 CNRS, Université Bordeaux I,
33405 Talence Cedex. France.

[§]Corresponding authors: J.F.Narbonne.

E-mail address: jf.narbonne@lptc.u-bordeaux1.fr

Tel: +33 5 40 00 24 56 ; Fax: + 33 5 40 00 87 19

Abstract

High-performance liquid chromatography method (HPLC) was applied to the evaluation of the testosterone metabolism in aquatic animals generally used as sentinel species (fish and molluscs). The preliminary results profiles of testosterone metabolites resulting from incubation of trout liver S9 *Oncorhynchus mykiss*, microsomes from clams *Corbicula fluminea* or mussels *Mytilus galloprovincialis* are compared. Main metabolites 6 β -hydroxytestosterone, 16 α -hydroxytestosterone, 11 β -hydroxytestosterone, 2 α -hydroxytestosterone, 2 β -hydroxytestosterone and androstenedione were detected and quantified in rat, fish and clam, while only 16 α -hydroxytestosterone and androstenedione metabolites were detected in mussels. The protocol presented in this study proves to be useful for biomarker based pollution surveys. Testosterone metabolites profiles detected in cellular fraction from animals studies were discussed.

Key words: HPLC, Testosterone metabolites, Fish and Molluscs

Introduction

The use of biomarkers measured at the molecular or cellular level have been proposed as sensitive “early warning” tools for biological effect measurement in environmental quality assessment. The biomarkers indicate that the organism has been exposed to pollutant (exposure biomarkers) and / or the magnitude of the organism’s response to the pollutant (biomarkers of effects or biomarkers of stress). Biomarkers are then defined as short-term indicators of long-term biological effects. [1]

Endocrine disrupting chemicals have recently attracted much scientific attention [2],[3]. These chemicals interact with the endocrine systems to disturb the hormone homeostasis. The potential effects of chemicals can alter the normal endocrine function and physiological status of animals and specially steroid metabolism and effect on reproduction. Early observations on endocrine disruptors were reported in aquatic ecosystems in particular in fish.

The main ovarian steroid in fish is 17β -estradiol. Differences exist with regard to the major androgens, where besides testosterone also 11Ketotestosterone or 11β -hydroxytestosterone are responsible for the development of male secondary sex characteristics and for the induction of spermatogenesis [4]

Testosterone is a substrate for many vertebrates P450s. enzymes. It is hydroxylated by different P450 isoenzymes. The cytochrome P-450 (CYP) monooxygenase system is a family of heme-thiolate proteins that function in the biotransformation of both endogenous and exogenous chemicals [5, 6]. Certain CYPs exhibit specificity towards the hydroxylation position, in a region-specific and stereo-specific manner. Thus, the hydroxylated metabolites profile of testosterone can serve as an index of the changes that occur in the expression of individual CYPs in hepatic microsomes [7]

In comparative toxicology studies, the biochemical techniques for biomarker measurement were based on rat tissues and then adapted to fish and invertebrates organisms. In the present work, we optimise a technique for analysis of steroid metabolites as biomarkers in fish and molluscs generally used as sentinels species in aquatic ecosystems[8],[9]. The aims of this study was to develop a fast, more simple, easy and more robust high performance liquid chromatography method for the quantitative analysis of testosterone hydroxylase activity in aquatic animals.

The approach described in this paper consists of a conventional HPLC–UV/fluorescence set-up using a monolithic porous silica column instead of a conventional particulate column. The advantageous feature of the monolithic column is the reduced pressure drop (flow : 10 mL/min with p around 100 bars) in comparison to a particulate column while maintaining resolution efficiencies. This is due to the biporous structure of the monolithic column which consists of macropores (2 μ m) and mesopores (13 nm). The macropores allow high flow-rates due to higher porosity and thus offer reduced flow resistance, whereas the mesopores provide the surface area for achieving sufficient capacity [10, 11, 12 ,13].

Materials and Methods

a)- Animals

Marine mussels, *Mytilus galloprovincialis* were collected from Arcachon bay, France. Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) from freshfarm "Moulin de la Cassadotte" in Biganos, France and asiatic clams (*Corbicula flumnea*) were collected from the eastern shore of Sainginet lake in the Aquitaine region (France).

b)- Chemicals

Steroid : Testosterone (4-androsten-17 β -ol-3-one), 6 β -hydroxytestosterone (4-androsten-6 β ,17 β -diol-3-one), 16 α -hydroxytestosterone (4-androsten-16 α , 17 β -diol-3one), 2 α - hydroxytestosterone (4-androsten-2 α , 17 β -diol-3-one) 97%, 11 β -hydroxytestosterone (4-androsten-11 β ,17 β -diol-3-one), 2 β -hydroxytestosterone (4-androsten-2 β ,17 β -diol-3-one) 98% and androstendione (4-androsten-3, 17 β -dione) 99% were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) (Figure 1)

Solvent : Methanol, 99.93% HPLC grade, Acetonitrile, 99.93 % HPLC grade, Methanol, 99.9 % HPLC grade and Trizma HCL 99,8% were purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

Glycerol redistilled, potassium dihydrogen phosphate, di-Potassium hydrogen phosphate and NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, reduced sodium salt) were purchased from Merck (Paris, France)

c)- Preparation of animals

All steps of dissection and homogenisation were performed at 4°C The Liver, from fish and digestive gland, gonad and gills from molluscs were taken out systematically.

liver from fish, digestive gland and gonad from mollusc was homogenized by glass potter B.Braun in phosphate buffer (pH= 7.4, 100mM) in a 1/3 w/v (weight/volume) ratio. The homogenate was centrifuged for 30min at 9000g (4°C) in a sigma Model 3MK centrifuger. The supernatant constitutes the S9 (post-mitochondrial fraction).

For S9 fraction of molluscs, was then centrifuged at 34000g for 1hour (4°C) in a Bekman Model LE-80 Ultracentrifuger (France). The supernatant represents the cytosolic fraction and the microsomes are found in the pellet.

The microsomal fraction (from molluscs) were resuspended in the same volume of a phosphate buffer (100mM, pH=7.4) containing glycerol (20% of the final volume). Aliquots were frozen at t= -80°C.

d)- Methods

The analysis for testosterone metabolism was based on the method described by Whalley [14] with modifications. That method is based on the use of [¹⁴C] testosterone and remains a heavy and expensive methodology. Moreover, radioactivity handling needs a specific dedicated bench which is often not available for laboratories working on routine-based analysis. For the previous reasons, the suggested method presented here appears as an alternative to the Whalley's one (see comparison in Table 1).

1- Sample preparation

- Incubation

Testosterone was incubated for 30min at 37°C in 250µl mixtures in a shaking water containing 142.5 µl of Tris buffer (pH=7.4, 0.1M), 80µl of liver microsomes, 2.5 µl of testosterone (10mM) and 25µl of NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced sodium salt) 10mM. Reactions were started by addition of the NADPH and stopped by addition of 250µl ice-cold methanol. Samples were

centrifuged at 1600g for 10min at 20°C and 400µl of the supernatant were collected for analysis

- Extraction

In order to separate testosterone metabolites from the rest of the microsomal or S9 fractions, we added acetonitrile (3 v/v) to the samples.. Purification of samples was performed using solide phase cartridges (C18 Extrat clean coloumn 200mg, Alltech France). In addition, extraction has also the advantage to concentrate the sample and enhance sensitivity of chromatographic assay, the column life time

- Evaporation:

The samples were evaporated with gentle stream of nitrogen. The dry residue was dissolved in 100µl of mobile phase (1-propanol (1/4),water). 30µl of the solution was then injected into the HPLC system.

2- Preparation of standard solutions

Testosterone and hydroxymetabolites were dissolved in methanol (1mg/ml) and stored at 4°C. Testosterone and metabolite reference solutions (mixtures solutions) were prepared (0,02mg/ml) by dilution in (1/50) 1-propanol /water a (mobile phase). The standard mixtures were used precisly identify the compounds.

3- High-performance liquid chromatography system

An HPLC system with auto sampler (1050 HP, Agilent, Waldbronn, Germany) consisting of a quaternary high-pressure pump, a quaternary low-pressure degassed, an and a SPD-10A UV/VIS spectrometric detector was used. The column was a (L=100 mm; ϕ = 4.6 mm) Chromolith Performance RP-18e (Merck, Darmstadt, Germany), equiped whith Chromolith Guard cartridge RP-18e (ϕ =4.6mm; L= 5mm).

The column was eluted by a gradient of 1-propanol (1/4) and water. A mobile phase was filtered through a 0.2µm nylon membrane before use.

The UV detector set at 254nm. HPLC chromatography was performed at room temperature (20-22°C).

Results

a)- Protocole optimisation

The testosterone metabolites are separated by HPLC with a Chromolith C18 column (Merck) in reverse phase. The identification of the testosterone elution peaks is carried out by comparing the retention time with standards elution peaks under the same conditions. During this study, we optimised the conditions of separation for the metabolites : the time of analysis was decreased by two fold. While the resolution factors was maintained for major metabolites: 6 β -hydroxytestosterone, 16 α -hydroxytestosterone, 11 β -hydroxytestosterone, 2 α -hydroxytestosterone, 2 β hydroxytestosterone and Androstenedione. Standards elution were presented in Figure 2.

The monolithic porous silica column allows high speed separation in combination with good separation Figure 2. This provides an excellent tool to modernise HPLC–UV routines in analytical support of *in vitro* cytochrome P450 assays.

b)-Application to animals

Testosterone was incubated with the S9 of rat liver, and the metabolites were then separated. For fish Testosterone was incubated with the S9 liver fraction of. The chromatogram show that we can detecte six signifiant metabolites of testosterone: 11 β -hydroxytestosterone 38% followed by 30 % of the androstendione and other metabolites such as 6 β -hydroxytestosterone, 2 α -hydroxytestosterone, 16 α -hydroxytestosterone (Figure 3). For *Corbicula fluminea*, testosterone was incubated with the microsomes of digestive gland. Results are represented in (Figure 4.) The metabolites are represented mostly by the 6 β -hydroxytestosterone (55%) followed by the androstendione. If we compare the CYP testosterone metabolites in fish and corbicula we need to take in account the difference between the cellular fractions incubated (S9 and microsomal fraction). When activities are related to the total cytochrome P450 present in the incubation mixture (70pmol cyt P450/mg Prot in fish and 51pmol cyt P450/mg Prot in corbicula), the specific activity in testosterone metabolism was found to be in the same range, (1.5nmol/min/nmol cyt P450).

In Mussels tissues: analyses were performed on several tissues such as mantle, digestive gland, gills, gonad and the whole animal. The analyses revealed the

presence of two metabolites, 16 α -hydroxytestosterone and androstenedione in all the tissues tested except in gills as indicated in Table 2.

Discussion

The cytochrome P450 (CYP) monooxygenase system is a family of heme-thiolate proteins that function in the biotransformation of both endogenous and exogenous chemicals [6]. Certain CYP exhibit specificity towards the hydroxylation position of testosterone. Thus, the hydroxylated metabolites profile of testosterone is one of index of the changes in the individual CYP in hepatic microsomes [7]. Testosterone was mainly biotransformed to androstenedione, a reaction probably catalyzed by a microsomal 17-hydroxysteroid oxydoreductase, although cytochrome P450 isozymes such as CYP2C11 have been reported to catalyze the 17 β dehydrogenation [15]. The hydroxylation of testosterone at the 6 β position is mainly catalyzed by the CYP3A/1A1, 16 α -hydroxytestosterone and androstenedione are catalyzed by CYP2B isozyme. In the rat CYP3A1 and CYP2B proteins are significant constitutive enzymes, contributing to 20% to 25 % of the total liver cytochrome. In our conditions, 16 α and 6 β -hydroxytestosterone was the predominant metabolites in rat liver incubations. In fish, 11 β -hydroxytestosterone is a major testosterone metabolite while CYP11, have not been yet characterized. However, for other major metabolites, androstenedione was higher than 6 β -hydroxytestosterone. This results are according with the relative abundance of cyt P450 in fish liver: CYP2B>CYP3A>CYP1A [16]. Incubation of corbicula microsomal fraction with testosterone demonstrated the ability of clams to metabolize testosterone in a NADPH-dependent reaction. The metabolites are represented mostly by the 6 β -hydroxytestosterone (55%) followed by the androstenedione and 2 β -hydroxytestosterone. Abundance of metabolite of testosterone in corbicula was submitted to seasonal variations, probably related to the hermaphroditism of this animal. In mussels [17] demonstrated presence of CYP in digestive gland, gill and other tissue. The levels of microsomal CYP content vary from 3-134pmol/mgProt for the mussels *Mytilus galloprovincialis* and *Mytilus edulis* [18]. The presence of CYP2B has already been observed by Peters [19]. Our results are according with this observation since we can detect two metabolites 16 α -hydroxytestosterone and androstenedione supposed catalyzed by CYP2B. Other invertebrate species have been shown to metabolize testosterone, although they

exhibit a different profile of metabolites. The major Phase I testosterone metabolites for the periwinkle *L. littorea* were dihydrotestosterone (24%) and dihydrotestosterone-diols (38%), androstenedione being only 5% of total testosterone metabolites [20]. Hydroxylated metabolites, particularly 6 β -hydroxytestosterone (17%) were also formed. In *Daphnia magna*, several hydroxylated testosterone metabolites (among them 6 β - and other unidentified forms) accounted for 60% of total testosterone metabolism [21]. Likewise, less polar metabolites, such as androstenedione (24%) and dihydrotestosterone (10%), were formed. All these results suggest the presence in invertebrates of a steroid hydroxylase system similar to the one observed in vertebrate species. Although the function of steroids in invertebrate species is not well understood yet, they appear to be involved in sex determination and reproduction function as in vertebrates.

Conclusion

Monolithic silica-based chromatography was successfully applied to cytochrome P450 derived marker. In comparison to previously reported methods, the optimisation of the parameters of testosterone metabolite analysis (run time, sensitivity and resolution) is able to provide an efficient methodology for CYP specific activity measurement and for disruption in steroid metabolism, frequently used as biomarker for in pollution monitoring program. Particularly, 6 β 16 α , 11 β , 2 α hydroxytestosterone and androstendione have been successfully characterized in S9 or microsomes of trout and asian clam. In future studies that method will be used for detection of CYP-like activities in environmental biomonitoring programmes for water quality assessment.

Acknowledgements

This work was supported by the European project Biological Effects of Environmental Pollution in marine coastal ecosystems: BEEP (Contract EVK3-CT2000-00025).is part of the EC IMPACTS cluster. We thank Dr Kramer, IECB, Pessac for critically reading the manuscript and correcting the English.

References

1. Mc Carthy, J.-F., and Shugart, L. R. (1990) Biomarkers of environmental contamination, Lewis, Boca Raton.
2. Colborn, T., vom Saal, F. S., and Soto, A. M. (1993) Environ Health Perspect 101:378-384.
3. Colborn, T., Smolen, M., and Rolland, R. (1996) Neurotoxicol Teratol 18:235-237; discussion 271-276.
4. Scott, A. P., and Sumpter, J. P. (1989) Gen.Comp.Endocr 73:46-58.
5. Wood, A. W., Ryan, D. E., Thomas, P. E., and Levin, W. (1983) J Biol Chem 258:8839-8847.
6. Guengerich, F. (1988) Cancer Research 48:2946-2954.
7. Sonderfan, A. J., Arlotto, M. P., Dutton, D. R., McMillen, S. K., and Parkinson, A. (1987) Arch Biochem Biophys 255:27-41.
8. Michel, X. R., Cassand, P. M., and Narbonne, J. F. (1993) Mutat Res 301:113-119.
9. Mora, P. (1998) Caractérisation des cholinestérases de 3 mollusques bivalves: *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*, *Corbicula fluminea*. Contribution au développement d'un biomarqueur de contamination des milieux marins et dulçaquicoles, University of Bordeaux 1, 237 p.
10. Minakuchi, H., Nakanishi, K., Soga, N., Ishizuka, N., and Tanaka, N. (1996) Anal. Chem 68:3498 -3501.
11. Minakuchi, H., Nakanishi, K., Soga, N., Ishizuka, N., and Tanaka, N. (1997) Journal of Chromatography A 762:135-146.
12. Cabrera, K., Wieland, G., Lubda, D., Nakanishi, K., Soga, N., Minakuchi, H., and Unger, K. K. (1998) TrAC Trends in Analytical Chemistry 17:50-53.
13. Tanaka, N., Nagayama, H., Kobayashi, H., Ikegami, T., Hosoya, K., Ishizuka, N., Minakuchi, H., Nakanishi, K., Cabrera, K., and Lubda, D. (2000) HRC Journal of High Resolution Chromatography 23:111-116.
14. Whalley, P. M., Bakes, D., Grime, K., and Weaver, R. J. (2001) J Chromatogr B Biomed Sci Appl 760:281-288.
15. Murray, M., and Horsfield, B. P. (1990) Journal of Steroid Biochemistry 36:569-574.

16. Fent, K., Woodin, B. R., and Stegeman, J. J. (1998) *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 121:277-288.
17. Livingstone, D. R., and Farrar, S. V. (1984) *The Science of The Total Environment* 39:209-235.
18. Livingstone, D. R., Kirchin, M. A., and Wiseman, A. (1989) *Xenobiotica* 19:1041-1062.
19. Peters, L. D., Nasci, C., and Livingstone, D. R. (1998) *Marine Environmental Research* 46:295-299.
20. Ronis, M. J. J., and Mason, A. Z. (1996) *Marine Environmental Research* 42:161-166.
21. Baldwin, W. S., and LeBlanc, G. A. (1994) *Aquatic Toxicology* 29:103-117.

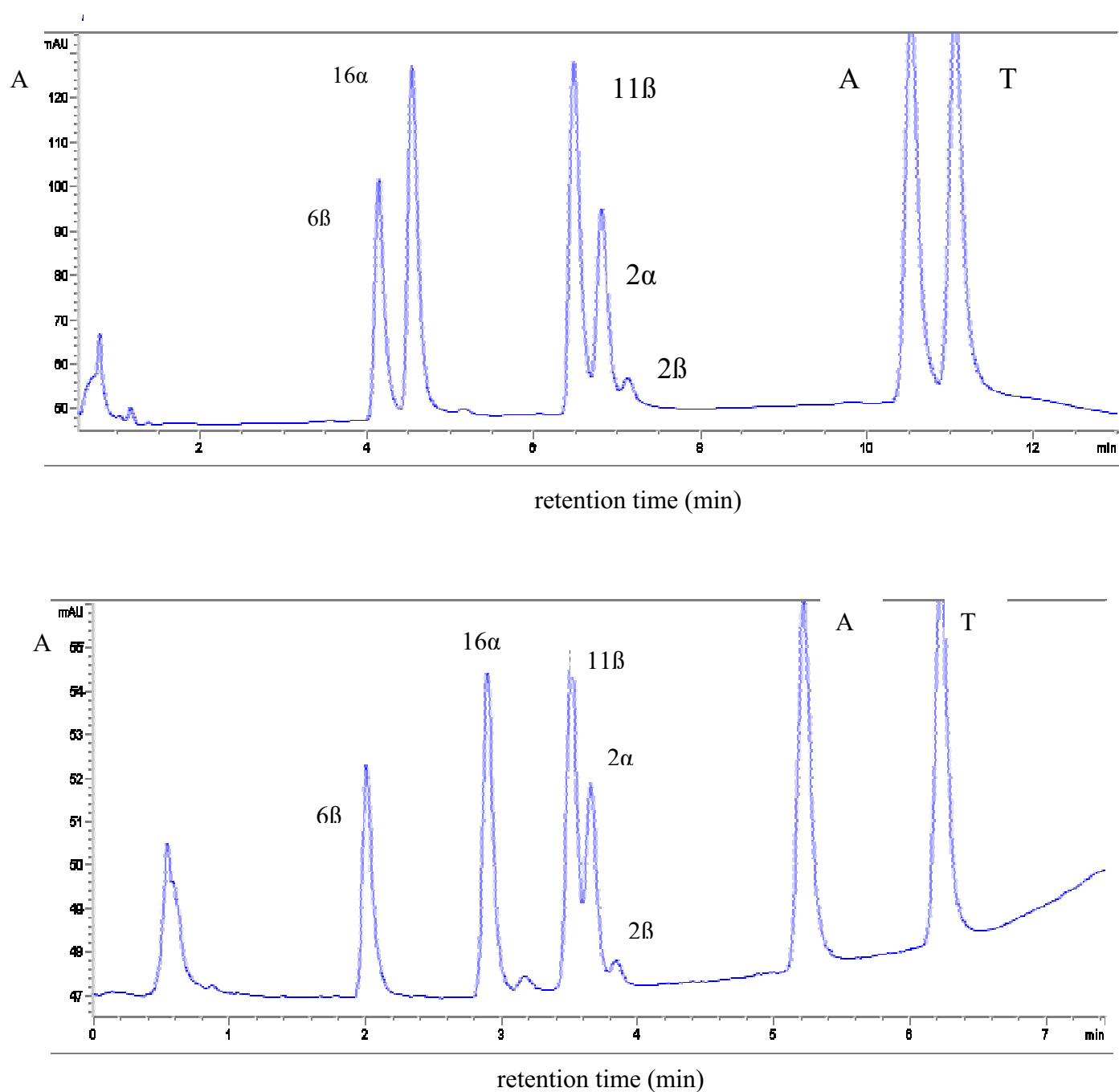
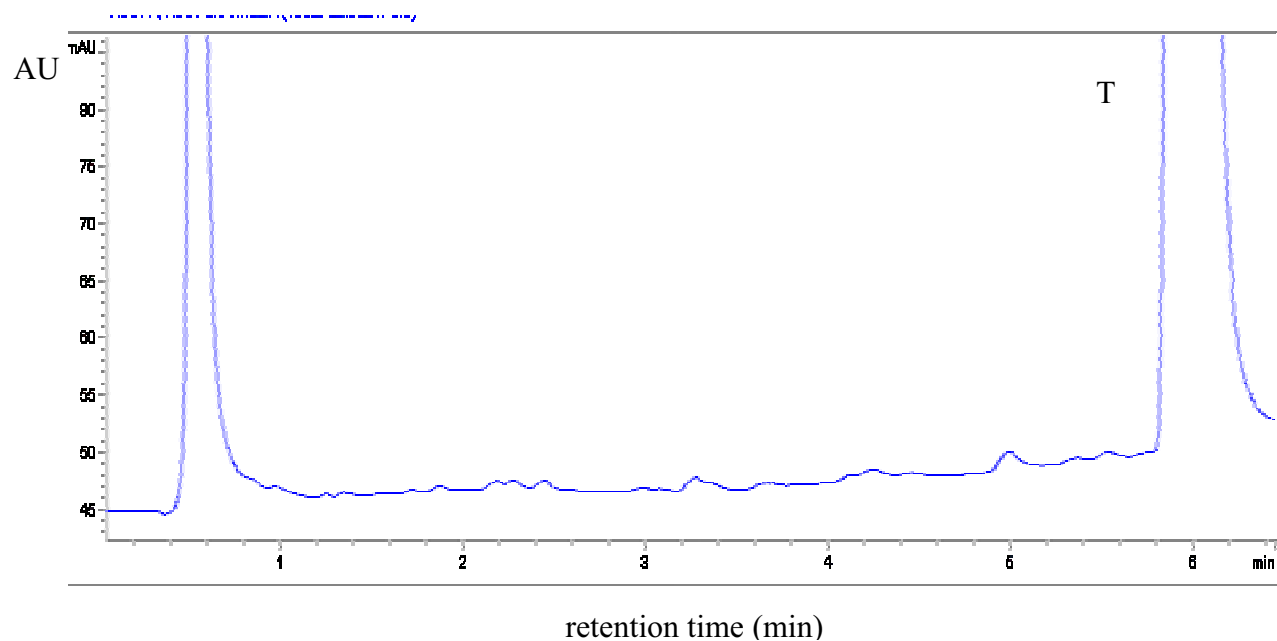


Figure 2: UV chromatogram of testosterone metabolites standards: 6β-hydroxytestosterone, 16α-hydroxytestosterone, 11β-hydroxytestosterone, 2α-hydroxytestosterone, 2β hydroxytestosterone, adrostenedione and testosterone.



b) S9 incubated with NADPH

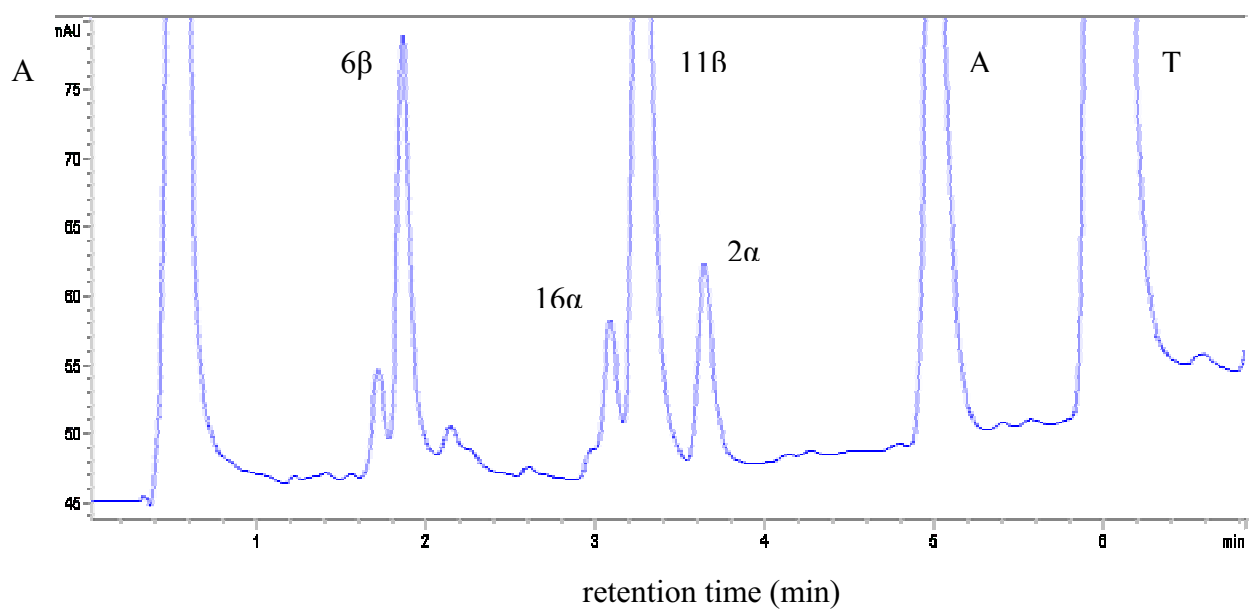


Figure 3: Chromatogram of fish liver S9 of Rainbow Trout a) blank b) S9 incubated with NADPH

Article 5 : *In vitro* metabolism of Testosterone in aquatic organisms

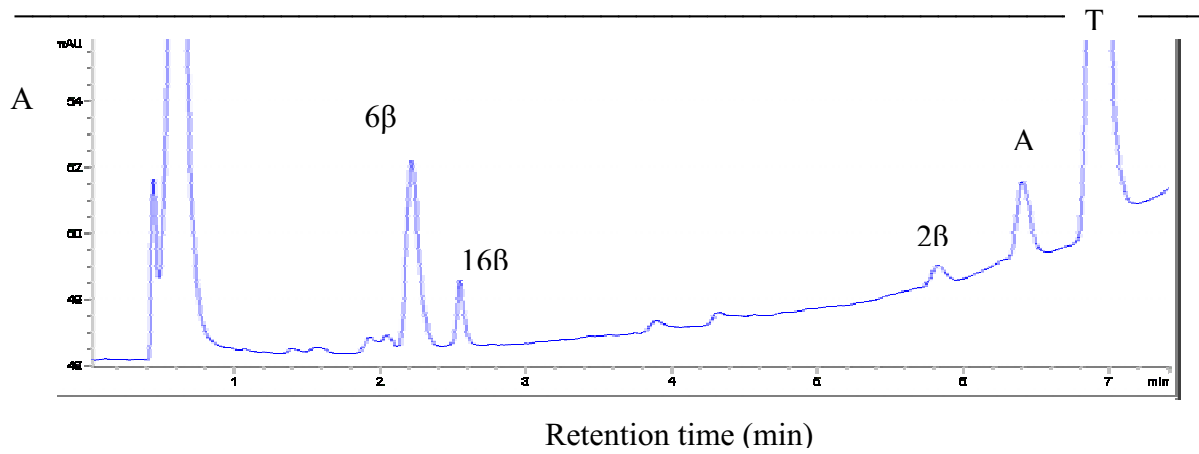


Fig 4: Chromatogram of corbicula microsomes incubated with Testosterone

	(Paul & al 2001) method	Our method
Mobile phase	Tetrahydrofurane/acetonitril and water	Propanol and water
Column	Hypersil BDS C18	Chromolith Performance RP-18e
Flow rate	1,25 ml/min	3ml/min
Temperature	40°C	20-24°C
Pression	-	80 Bar
Substrat	¹⁴ C Testosterone	Testosterone
Incubation	5 min	30 min
Extraction	-	Acétonitril
Run time	15 min	7 min

Table1: Comparison between initial method describe by whalley *et al* 2001 and final protocol performed in our conditions.

Tissues	Testosterone
gonad	+++
digestive gland	++
mantle	+
whole animal	+
gills	not detected

Table 2: Relative activity quantity of testosterone metabolism according to the tissue.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion Générale et perspectives

Le travail réalisé dans cette thèse est situé à l'interface de deux classes de biomarqueurs : les biomarqueurs d'exposition et les biomarqueurs d'effets. Il s'agit d'une recherche transversale qui intègre à la fois des mesures réalisées en milieu dulçaquicole et en milieu marin, un suivi chez les vertébrés et les invertébrés, et enfin des approches expérimentales *in vivo* et *in vitro*. Ce travail contribue à une démarche générale d'évaluation des risques provoqués par la contamination chimique sur les écosystèmes aquatiques.

L'intensité croissante des activités humaines le long des côtes entraîne de graves répercussions sur les habitats côtiers et sur les processus écologiques. Malheureusement, et malgré toutes les mesures préventives mises en place, il faut s'attendre à de nouveaux accidents pétroliers et/ou chimiques et les contaminations chroniques ne peuvent pas être éliminés à 100%. Le taux de pollution 0 est un objectif vers lequel il faut tendre, mais qui ne peut être atteint dans les zones à activités humaines importantes. C'est pourquoi il est nécessaire de développer des moyens de surveillance adaptés.

L'objectif de notre travail a été, dans un premier temps, de démontrer l'intérêt de l'utilisation d'une approche «multimarqueurs» en milieux marin et dulçaquicole, afin de mieux cerner les réponses biologiques à des contaminations chimiques. Dans cette perspective, nous avons évalué l'expression de différents biomarqueurs pouvant rendre compte du niveau de contamination de l'environnement aquatique par des polluants, chez les bivalves et chez les poissons. L'ensemble des résultats, obtenus au cours de ce travail met clairement en évidence l'utilité de cette approche multimarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. Pour les deux milieux aquatiques, les différents sites ont pu être classés selon leurs niveaux de réponses aux polluants avec une certaine cohérence par rapport aux dosages chimiques effectués et aux données bibliographiques.

L'écosystème est un milieu complexe dans lequel les effets de chaîne trophique et les effets biologiques se superposent. A cause de cette complexité, l'interprétation des résultats demande une grande prudence afin de ne négliger aucun des facteurs biotiques et abiotiques pouvant être impliqués dans les variations mesurées.

Evaluer la qualité des milieux aquatiques au moyen d'une seule espèce sentinelle s'avère être une démarche relativement restrictive du fait de la complexité du milieu, et de fait, il est souvent difficile d'interpréter les résultats qui font naître d'autres questions. Par exemple, le poisson est un excellent organisme sentinelle, mais sa mobilité plus au moins grande selon les espèces, peut empêcher de localiser avec précision la source d'une pollution éventuellement détectée.

L'idée d'une approche qui combine la mesure de plusieurs marqueurs biologiques fournissant des données les plus pertinentes sur le statut des ressources aquatiques permet de pallier le peu de connaissances sur la physiologie de l'animal et les interférences avec les facteurs environnementaux. Certaines équipes étudient de nouvelles espèces comme les crustacés *Eurytemora affinis* (programme Seine Aval (2002-2006)) ou *Tigriopus brevicornis* (Barka *et al.*, 2001 ; Forget *et al.*, 2002, 2003) de la famille des copépodes qui par leurs caractéristiques biologiques et morphologiques pourraient donner des informations complémentaires quant à la pollution de la colonne d'eau.

D'autre part, ce travail a permis de mettre au point le dosage des perturbateurs endocriniens (biomarqueurs d'effets) sur les vertébrés et les invertébrés *in vivo* et *in vitro* au sein du laboratoire.

L'utilisation de biomarqueurs d'effets semble, *a priori*, plus prometteuse pour une application *in situ*. En effet, l'interprétation des biomarqueurs d'exposition, bien que plus sensibles, nécessite le plus souvent la connaissance d'un historique sur la contamination chimique du site considéré.

Le développement des biomarqueurs d'effets permettra de mieux appréhender les impacts de la contamination observée chez les espèces aquatiques dans la perspective de leur conservation.

L'évaluation des effets potentiels des contaminants sur le système endocrinien des poissons et des bivalves, prélevés en milieu naturel ou exposés aux toxiques en laboratoire, mieux maîtrisée, pourrait entrer dans les programmes de surveillance de la santé des écosystèmes aquatiques.

Il est à noter que la physiologie des mollusques et plus précisément de la moule est encore très peu connue. A plus long terme, une étude détaillée de la physiologie de ce bivalve serait judicieuse car elle permettrait d'approfondir les différents mécanismes engendrés par une exposition aux contaminants. Par ailleurs,

l'utilisation de techniques plus sensibles utilisant des anticorps spécifiques après purification de protéine ressemblant à la vitellogénine chez la moule serait profitable.

Les études histopathologiques du foie de poissons intoxiqués par des concentrations sub-létales d'un mélange de plusieurs contaminants (conditions rencontrées dans les milieux naturels) qui permettraient d'analyser leurs interactions sont actuellement rares. Cette technique combinée à d'autres approches notamment biochimiques peut permettre d'apporter des éléments de réponse à l'interprétation globale des résultats (Lemaire-Gony S & Lemaire 1992).

Un suivi sur le terrain, sur plusieurs années, aiderait à rechercher l'impact des substances testées sur la fécondité et la reproduction de populations de poissons en milieu naturel. Mais cela demande un investissement à long terme. Des alternatives plus rapides comme des mesures de paramètres sub-létaux sur les individus se sont donc développées : présence d'ovocytes dans les testicules de poissons mâles, induction de vitellogénine chez les poissons mâles,... (Gimeno *et al.* ; 1998 ; Jobling *et al.* ; 1998, Minier *et al.* ; 2000 , Landriau-Gallien. ; 2003),

L'utilisation du modèle *in vitro* de cultures primaires d'hépatocytes de truite arc-en-ciel a permis de tester le potentiel oestrogénique de quelques contaminants, mais ce système *in vitro* ne peut se substituer aux recherches des biomarqueurs qui renseignent sur les effets d'une pollution à l'échelle cellulaire. Donc il est impossible d'extrapoler ces résultats à un niveau biologique supérieur, individu ou population. En revanche, ils permettent d'orienter et de cibler les recherches à mener *in vivo*.

Finalement, l'ensemble de ces recherches devrait permettre de développer et d'utiliser des nouveaux biomarqueurs en écotoxicologie dans la perspective d'une meilleure évaluation de la qualité de l'environnement. D'autre part, l'utilisation d'une approche multimarqueurs est vivement souhaitable car elle permet d'avoir une réponse plus proche de la réalité.

Les substances perturbatrices du système endocrinien (PE) peuvent produire des effets sur la croissance, le développement et la reproduction des organismes qui composent le biote, même à des concentrations extrêmement faibles, et ces effets peuvent se répercuter d'une génération à l'autre. Les PE comprennent des produits pharmaceutiques, des pesticides, des substances chimiques industrielles, des métaux et des composés naturels que l'on retrouve dans les effluents urbains, les

rejets d'exploitations agricoles, d'usines de textile et de pâtes à papier ou autres et de mines. En outre, on peut établir des liens entre des troubles cognitifs et neuro-comportementaux chez des jeunes enfants et leur exposition prénatale à des perturbateurs endocriniens. Par conséquent, ces substances continueront de susciter un grand intérêt à l'échelle internationale. Les résultats des tests en laboratoire doivent être reliés à leur portée écologique dans l'environnement qui retentit sur tout un écosystème. Les connaissances sur les effets des faibles doses et la recherche des seuils méritent d'être améliorées. L'élaboration d'un cadre pour l'analyse des risques liés aux interactions des perturbateurs endocriniens dans les mélanges et les effluents proposerait une base pour une surveillance efficace de l'environnement.

Les expériences en laboratoire sur l'incidence toxicologique d'une exposition constante d'organismes aquatiques à de faibles concentrations de composés chimiques artificiels ou sur les effets sub-létaux plus subtils des pesticides (par exemple, sur le fonctionnement des systèmes immunitaire et reproducteur) sont encore peu nombreuses. Pour mesurer les conséquences de ces effets au niveau des populations et des communautés, nous devons pouvoir établir des rapports entre les effets observés au niveau biochimique et la santé des organismes, et donc de la santé de la population.

Les responsables à tous niveaux, doivent prendre des mesures pour réduire l'exposition aux PE et les risques que celle-ci comporte pour la population et l'environnement.

Les programmes de surveillance de la santé environnementale et humaine doivent être modifiés et améliorés si l'on veut établir les ressources qui nous permettront de détecter l'exposition et les effets subtils à des stades de développement critiques des organismes qui composent le biote et des humains.

Il serait intéressant de mener des recherches supplémentaires approfondies sur l'ampleur des effets et sur la possibilité de récupération aux différents niveaux de l'écosystème, à la suite d'expositions épisodiques aux différents polluants et mélanges.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BIBLIOGRAPHIE

- Aas, E., Beyer, J., Jonsson, G., Reichert, L. W., and Andersen, O. K., 2002, Evidence of uptake biotransformation and DNA binding of polyaromatic hydrocarbons in Atlantic cod and coworking wrasse caught in the vicinity of an aluminium works. *Marine Environmental Research*, **52**, 213-229.
- Adamanpoilos, D., Pappa, A., Nicopoulo, S., Andreou E., Karamertzanis, M., Michopoulos, J., Deligianni, V, Simou, M., 1996, Seminal volume and total sperm number trends in men attending subfertility clinics in the greater Athens area during the period 1977-1993. *Human Reproduction*, **11**, 1936-1941.
- Addison, R. E., AJ, 1988, Hepatic microsomal monooxygenase activity in flounder *Platichthys flesus* from polluted sites in Langesundfjord and from mesocosms experimentally dosed with diesel oil and copper. *Marine Ecology Progress Series*, **46**, 51-54.
- Amacher, D. E., Fasulo, L. M., Charuel, C., Comby, P., and Beaumont, K., 1998, *In vitro* toxicity of zamifenacin (UK-76,654) and metabolites in primary hepatocyte cultures. *Xenobiotica*, **28**, 895-908.
- Akcha, F., Burgeot, T., Venier, P., and Narbonne, J. F., 1999, Relationship between kinetics of benzo[a]pyrene bioaccumulation and DNA binding in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **62**, 455-62.
- Akcha, F., Vincent Hubert, F., and Pfohl-Leszkowicz, A., 2003, Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. *Mutation Research*, **534**, 21-32.
- Allen, Y., Matthiessen, P., Scott, A. P., Haworth, S., Feist, S., and Thain, J. E., 1999, The extent of oestrogenic contamination in the UK estuarine and marine environments--further surveys of flounder. *The Science of the Total Environment*, **233**, 5-20.
- Andersen, H. R., Andersson, A. M., Arnold, S. F., Autrup, H., Barfoed, M., Beresford, N. A., Bjerregaard, P., Christiansen, L. B., Gissel, B., Hummel, R., Jorgensen, E. B., Korsgaard, B., Le Guevel, R., Leffers, H., McLachlan, J., Moller, A., Nielsen, J. B., Olea, N., Oles-Karasko, A., Pakdel, F., Pedersen, K. L., Perez, P., Skakkeboek, N. E., Sonnenschein, C., Soto, A. M., 1999, Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. *Environmental Health Perspective, Suppl 1*, **107**, 89-108.

Références bibliographiques

- Andersson, P. L., Blom, A., Johannisson, A., Pesonen, M., Tysklind, M., Berg, A. H., Olsson, P. E., and Norrgren, L.,1999, Assessment of PCBs and hydroxylated PCBs as potential xenoestrogens: In vitro studies based on MCF-7 cell proliferation and induction of vitellogenin in primary culture of rainbow trout hepatocytes. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **37**, 145-150.
- Arukwe, A., Knudsen, F. R., and Goksoyr, A.,1997, Fish zona radiata (eggshell) protein: a sensitive biomarker for environmental estrogens. *Environmental Health Perspective*, **105**, 418-422.
- Ashfield, L. Pottinger.,TG, and Sumpter, J.P,1998, Exposure of female juvenile rainbow trout to alkylphenolic compounds results in modification to growth and ovosomatic index. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **17**, 679-686.
- Auffret, M., Mujdzic, N., Corporeau, C., and Moraga, D.,2002, Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Marine and Environmental Research*, **54**, 585-589.
- Aust, S. D., Morehouse, L. A., and Thomas, C. E.,1985, Role of metals in oxygen radical reactions. *Journal of Free Radical Biology and Medicine*, **1**, 3-25.
- Auger J., Kustmann J. M., Czyglik F., Jouannet P.,1995, Decline in semen quality among fertile men in paris during the past years. *New England Journal of Medicine*, **332** : 281-285.
- Axiak, V., Micallef, D., Muscat, J., Vella, A., and Mintoff, B. 2003,Imposex as a biomonitoring tool for marine pollution by tributyltin: some further observations. *Environment International* **28** (8),743-749.
- 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'électricité et observation directe. Doctorate Thesis, Université de Liège, Belgique.
- Barka, S., Pavillon, J., and Amiard, J.,2001, Influence of different essential and non-essential metals on MTLP levels in the copepod *Tigriopus brevicornis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **128 C**, 479-493.
- Barra, R., Orrego, R., Gavilà, J.F., Parra, O. (2000) in *SETAC 21st annual meeting 12-16 november, 2000*, Environmental Sciences in the 21st century, paradigms, opportunities and challenges., Nashville, Tennessee.
- Baumard, P. B., 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.

Références bibliographiques

- Beyer, J. 1996, Fish biomarkers in marine pollution monitoring: evaluation and validation in laboratory and fields studies. Doctorate Thesis, University of Bergen.
- Bitar, G., 1987, Etude de peuplements benthiques littoraux des côtes Atlantiques et Méditerranéennes du Maroc : Impact de la pollution - Comparaison biogéographique. Thèse de Doctorat d'Etat, Université Aix-Marseille II, 389pp.
- Bocquene, G., Galgani, F., and Truquet, P., 1990, Characterisation and assay for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. *Marine Environmental Research*, **30**, 75-89.
- Bocquené, G. B., C, Cadiou Y, Galgani F., 1995, Joint action of combinations of pollutants on the acetylcholinesterase activity of several marine species., *Ecotoxicology*, **4**, 266-279.
- Bolognesi, C. R., R. , Roggier, P., 1996, Genotoxicity biomarkers in *M. galloprovincialis* as indicators of marine pollution. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **113C**, 319-323.
- Bon, E., Barbe, U., Nunez Rodriguez, J., Cuisset, B., Pelissero, C., Sumpter, J. P., and Le Menn, F., 1997, Plasma vitellogenin levels during the annual reproductive cycle of the female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): establishment and validation of an ELISA. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **117B**, 75-84.
- Boon, J. P., Everaarts, J. M., Hillebrand, M. T., Eggens, M. L., Pijnenburg, J., and Goksoyr, A., 1992, Changes in levels of hepatic biotransformation enzymes and haemoglobin levels in female plaice (*Pleuronectes platessa*) after oral administration of a technical polychlorinated biphenyl mixture (Clophen A40). *The Science of the Total Environment*, **114**, 113-133.
- Boryslawskyj, M., Garrod, A.C., Pearson, J.T., and Woodhead, D., 1988, Elevation of glutathione-S-transferase activity as a stress response to organochlorine compounds, in the freshwater mussel, *Sphaerium corneum*. *Marine Environmental Research*, **24**, 101-104.
- Botticelli, C. R., Hisaw, F.L. & Wotiz, H.H., 1961. Estrogens and progesterone in the sea urchin (*Strongylocentrotus franciscanus*) and Pecten (*Pecten hercicus*). *Proceedings of the Society for the Experimental Biology and Medicine*, **106**, 887-889.
- Bradford, M., 1976, A rapid and sensitive assay of protein utilizing the principle of dye binding. *Analytical Biochemistry*, **772**, 248-264.
- Braunbeck, T., Gorge, G., Storch, V., and Nagel, R., 1990, Hepatic steatosis in zebra fish (*Brachydanio rerio*) induced by long-term exposure to gamma-hexachlorocyclohexane. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **19**, 355-374.

Références bibliographiques

- 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.
- Bucheli, 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.
- Budzinski, H. L., M. Garrigues,P. Le Menach,K.,1999, Optimisation of the microwave-assisted extraction in open cell of PAHs from soils and sediments. Study of moisture effect. *Journal of Chromatography*, **837**, 187-200.
- Budzinski, H. L., M. Thompson, S. Le Menach, K, 2000, Combined protocol for the analysis of PAHs and PCBs from sediments using focused microwave assisted (FMW) extraction and purification. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **367**, 165-171.
- Buege, J. A., and Aust, S. D.,1978, Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, **52**, 302-310.
- Burgeot, T., Bocquene, G., Pingray, G., Godefroy, D., Legrand, J., Dimeet, J., Marco, F., Vincent, F., Henocque, Y., and Jeanneret, H. O.,1994, Monitoring biological effects of contamination in marine fish along French coasts by measurement of ethoxyresorufin-O-deethylase activity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **29**, 131-147.
- 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.
- Campbell, C. M., and Idler, D. R.,1980, Characterization of an estradiol-induced protein from rainbow trout serum as vitellogenin by the composition and radioimmunological cross reactivity to ovarian yolk fractions. *Biology Reproduction*, **22**, 605-617.
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., Skakkebaek, N. E.,1995., Declining semen quality and increasing incidence of testicular cancer : is there a common cause ? . *Environmental Health Perspective, Suppl 7*, **103**,137-139.
- Carnevali, O., Mosconi, G., Yamamoto, K., Kobayashi, T., Kikuyama, S., and Polzonetti-Magni, A. M.,1992, Hormonal control of in vitro vitellogenin synthesis in *Rana esculenta* liver: effects of mammalian and amphibian growth hormone. *General and Comparative Endocrinology*, **88**, 406-414.
- Carrilo, M. M., E., Sorbera, L., Mylonas, C.C., Cuisset, B., Zohar Y.& Zanuy, S. (1999) in *Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish.*, Bergen, Norway.

Références bibliographiques

- Chipman, J. K., and Marsh, J. W., 1991, Bio-techniques for the detection of genetic toxicity in the aquatic environment. *Journal of Biotechnology*, **17**, 199-208.
- Clairborne, A., 1985, Catalase activity in *Handbook of methods for oxygen radical research*, edited by Greenwald (Boca Raton: CRC Press), 283-284.
- Claissé, D., 1989, Chemical contamination of French coasts. The results of a ten years Mussel Watch. *Marine Pollution Bulletin*, **20**, 523-528.
- Colborn, T., and Smolen, M. J., 1996, Epidemiological analysis of persistent organochlorine contaminants in cetaceans. *Review of Environmental Contamination Toxicology*, **146**, 91-172.
- Collier, T. K., and Varanasi, U., 1991, Hepatic activities of xenobiotic metabolizing enzymes and biliary levels of xenobiotics in English sole (*Parophrys vetulus*) exposed to environmental contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **20**, 462-73.
- Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M. C., Babut, M., Exinger, A., and 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**, 122-31.
- Cuisset, B., Pellissero, C., Le Menn, F. and Nunez Rodriguez, J. (1991) in *Proceeding of the First International Symposium on Acipenser*, Bordeaux 1989, 107-111.
- Cuisset, B., Pellissero, C., Kime, D.E., Kuhn, E.R., Babin, P., Davail, S., & Le Menn F., 1994, Enzyme immunoassay for 11-ketotestosterone using acetyl-cholinesterase as label : application to sex identification in farm Siberian sturgeon. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **108 C**, 229-241.
- Davail, B., Pakdel, F., Bujo, H., Perazzolo, L. M., Waclawek, M., Schneider, W. J., and Le Menn, F., 1998, Evolution of oogenesis: the receptor for vitellogenin from the rainbow trout. *Journal of Lipids Research*, **39**, 1929-37.
- 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 Longcamp, P. D., Drosdowsky, M. & Lubet P., 1970. Endocrinologie des invertébrés - Biosynthèse des stéroïdes chez les mollusques. Mise en évidence d'une 17- β -hydroxystéroïde déshydrogénase dans les gonades de *Mytilus edulis* L. (Mollusques bivalves). **271**: Compte-Rendus de l'Académie des Sciences de Paris - Série D,
- Depledge, M.H., Fossi, M.C., 1994, The role of biomarker in environmental assessment,

Références bibliographiques

- Ecotoxicology*, **3**, 161-172.
- Di Giulio, R. T., Washburn, P. C., Wenning, R. J., Winston, G. W. and Jewell, C. S.,1989, Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **8**, 1103-1123.
- Di Giulio, R. T., Habig, C., Gallagher, E.P.,1993, . Effects of black Rock Harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress and DNA integrity in channel fish. *Aquatic Toxicology*, **26**, 1-22.
- Dradignac-Corbeil, M. J.,1976, La moule. *Revue des Travaux. De l'Institut de Pêche Maritimes*. Casablanca, Maroc, **10**, 315-343.
- Eertman, R.H.M., Groenink, C.L.F.M.G, Sandee, B, Hummel, H and Smaal, A.C,1995, Response of the blue mussel *Mytilus edulis* L. following exposure to PAHs contaminated sediment. *Marine Environmental Research*, **39**, 169-173.
- 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.
- FAO,1986, International code of conduct on the distribution and use of pesticides. *Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations.*, 28.
- Farnsworth, N. R. B., A. S, Cordell, A, Crane, F. A and Fong, H. H. S.,1975, Potential value of plants as sources of new antifertility agents II. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **64**, 717-754.
- Fisher, W. S.,1988, Environmental influence on bivalve haemocyte function. *American Fisheries Special Publication*, **18**, 225-237.
- Fitzpatrick, P. J., O'Halloran, Sheehan, D., Walsh, A.R.,1997, Assessment of a glutathion S-transférase and related proteins in the gills and digestive gland of *Mytilus edulis* (L.), as potential organic pollution biomarkers. *Biomarkers*, **2**, 51-56.
- Flammarion, P., Garric, J.,1997, . Cyprinids erod activities in low contaminated rivers: a relevant statistical approach to estimate reference levels for EROD biomarker ?, *Chemosphere*, **35**, 2375-2388.
- 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.
- Flouriot, G., Pakdel, F., Ducouret, B., and Valotaire, Y.,1995, Influence of xenobiotics on

Références bibliographiques

- rainbow trout liver estrogen receptor and vitellogenin gene expression. *Journal of Molecular Endocrinology*, **15**, 143-51.
- Forget, J., Livet, S., and Leboulenger, F.,2002, Partial purification and characterization of acetylcholinesterase (AChE) from the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Poppe). *Comparative Biochemistry and Physiology C*, **132**, 85-92.
- Forget, J., Beliaeff, B., and Bocquene, G.,2003, Acetylcholinesterase activity in copepods (*Tigriopus brevicornis*) from the Vilaine River estuary, France, as a biomarker of neurotoxic contaminants. *Aquatic Toxicology*, **62**, 195-204.
- Fry, D.M., and Toone, C. K.,1981, DDT-induced feminization of gull embryos. *Science*, **213**, 922-4.
- Gagné, F., Blaise, C., Lachance, B., Sunahara, G.I., Sabik, H.,2001, Evidence of coprostanol estrogenicity to the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Environmental Pollution*, **115**, 97-106.
- Gibbs, P.E. and Bryan, G.W.,1986., Reproductive failure in populations of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, caused by imposex induced by tributyltin from antifouling paints. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom.*, **UK 66**, 767-777.
- Gimeno, S., Komen, H., Venderbosh, P.W.M. and Browmer, T,1998, Feminisation of young males of the common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during sexual differentiation. *Aquatic Toxicology*, **43**, 77-92.
- Goksoyr, A.,1991, A semi-quantitative cytochrome P4501A1 ELISA: A simple méthode for studying the monooxygenase induction response in environmental monitoring and ecotoxicological testing in fish. *The Science of the Total Environment*, **101**, 255-262.
- Greenwald, R. A.,1985, Therapeutic benefits of oxygen radicals scavenger treatment remain unproven. *Free Radical Biology and Medicine*, **1**, 173-177.
- Gross, T. S., Wieser, C.M., Kernaghan, N.J. & Ruessler, D.S., 2003. Development and validation of procedures for monitoring endocrine and reproductive function in freshwater mussels.
<http://cars.er.usgs.gov/posters/ecotoxicologie/endrocine/endrocine.html>;
- Habig, W.H., Pabst, M. J., and Jakoby, W. B.,1974, the first enzymtic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, **249**, 7130-7139.
- Hagerman, D. D., Wellington, F.M. & Villedie, C.A., 1957,Estrogens in marine invertebrates. *Biological Letters*, **1112**,180-183.
- 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*

Références bibliographiques

Chemistry, **17**, 448-45.

- Hathaway, R. R. 1965. Conversion of estradiol-17 β in sperm preparations of sea urchins and oysters. *General and Comparative Endocrinology*, **5** (5), 504-508.
- Hines, G. A., Watts, S. A., Walker, C. W., and Voogt, P. A. 1992. Androgen metabolism in somatic and germinal tissues of the sea star *Asterias vulgaris*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **102** (3), 521-526.
- 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.
- Idler, D.R., and Campbell, C.M., 1980, Gonadotropin stimulation of estrogen and yolk precursor synthesis in juvenile rainbow trout. *General Comparative Endocrinology*, **41**, 384-91.
- Jensen, T.K., Toppari, J., Keiding, N., Skakkebaek N. E., 1995, Do environmental estrogens contribute to the decline in male reproductive health ? *Clinical Chemistry*, **12**, 1896-1901.
- Jobling, S, Nolan, M, Tyler, CR, Brighty, G, Sumpter, JP. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science and Technology*, **32**, 2498-2506.
- Jobling, S, Sheahan, D, Osborne, JA, Matthiessen, P, Sumpter JP, 1996., Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **15**, 194-202.
- Johnson, LL, Cassillas, E., Collier, T.K., Mc Cain, B.B, and Varanasi, U ,1988, Contaminant effects on ovarian development in English Sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, Washington. *Canadian Journal of Aquatic Sciences*, **45**, 2133-2146.
- Kikagawa, K. K., T and Kosugi, H., 1990, Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoid. *Journal of the National Cancer Institute*, **69**, 205-209.
- KIME, D. E. a. M., N. J., 1982, Seasonal patterns of free and conjugated androgens in the brown trout (*Salmo trutta*). *General Comparative Endocrinology*, **48**, 222-231.
- 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**, 761-9.
- Kramer, K. J. H. D. D., 1989, The valve movement response of mussel: a tool in biological

Références bibliographiques

- monitoring. *Hydrobiology*, **188/189**, 433-443.
- Labrot, F. R. D., Tisnerat G, Cabridenc R, Narbonne JF,1996a, Le plomb dans l'environnement : sources, mécanismes de transfert et effets biologiques. Dans: "Aspects analytiques du plomb dans l'environnement" . *coordonateur M. Morlot, Lavoisier Tec & Doc éditions*, 3-15.
- Labrot, F. R., D, Saint-Denis M, Narbonne JF,1996b, *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.
- Lagadic, L. C. T., Amiard JC,1997., Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. In : Lagadic L, Caquet T, Amiard JC and Ramade F (Eds.), Biomarqueurs en Ecotoxicologie. *Aspects Fondamentaux. Masson, Paris*, 1-9.
- Lagbouri, A.1997, Etude de la biologie de *Donax trunculus* dans la baie d'Agadir et de sa réponse à la pollution à travers trois biomarqueurs (Acétylcholinesterase, peroxydation lipidique et Gluthation S-Transferase). Doctorate Thesis, IBNO ZOHR.
- Landner, L., Grahn, O., Hardig, J., Lehtinen, K. J., Monfelt, C., and Tana, J.,1994, A field study of environmental impacts at a bleached kraft pulp mill site on the Baltic Sea coast. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **27**, 128-57.
- Landriau-Gallien, I , 2003, Etude de l'altération fonctionnelle du système reproducteur par les perturbateurs endocriniens. Caractérisation des effets, identification des xéno-œstrogènes impliqués de poisson en estuaire et Baie de Seine. Doctorate Thesis, Le Havre.
- Le Blanc, G. A., Stuart, J. D., Dunn, S. E., and Baldwin, W. S.,1994, Effect of the plant compound indole-3-carbinol on hepatic cholesterol homeostasis. *Food and Chemical Toxicology*, **32**, 633-9.
- Le Menn, F.,1979, Induction of vitellogenin by estradiol and androgens in a teleostean fish: *Gobius niger*, *L.C.R. Académie des Sciences, Paris*, **289**, 413-416.
- Lee, Y. J., and Gorski, J.,1996, Estrogen-induced transcription of the progesterone receptor gene does not parallel estrogen receptor occupancy. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*, **93**, 15180-4.
- Lemaire, P., Matthews, A., Forlin, L., and Livingstone, D. R.,1994, Stimulation of oxyradical production of hepatic microsomes of flounder (*Platichthys flesus*) and perch (*Perca fluviatilis*) by model and pollutant xenobiotics. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **26**, 191-200.
- Lemaire, P. L. D.,1993, Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotic interactions

Références bibliographiques

- in marine organisms, in particular the flounder *Platichthys flesus* and the mussel *Mytilus edulis*. *Trends in Comparative Physiology*, **1**, 1119-1150.
- Lemaire-Gony, S. L., P,1992, Interactive effects of cadmium and benzo(a)pyrene on cellular structure and biotransformation enzymes of the liver of the European eel, *Anguilla anguilla*. *Aquatic Toxicology*, **22**, 145-160.
- Li, Q., Osada, M., Suzuki, T. & Mori, K., 1998, Changes in vitellin during oogenesis and effect of estradiol-17 β on vitellogenesis in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Invertebrate Reproduction and Development*, **33** (1),87-93.
- Lindström-Seppä, P., Koivusaari, U., and Hänninen, O.,1983, Metabolism of foreign compounds in freshwater crayfish (*Astacus astacus* L.) tissues. *Aquatic Toxicology*, **3**, 35-46.
- Livingstone, D., Lips F, Garcia Martinez P, Pipe RK,1992, Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, **112**, 265-276.
- Livingstone, D.,1993, Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **57**, 195-211.
- Livingstone, D. R.,1998, The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comparative biochemistry and physiology part A : Molecular & integrative physiology*, **120**, 43-49.
- Lubet, P., and Bourcart, C.,1963, Recent observations on the sexual physiology of *Mytilus Galloprovincialis* Lamarck. *Compte Rendu de Séance de la Société de Biologie*, **157**, 1996-1998.
- Lubet, P., and Chappuis, J. G.,1964, Study of water filtration in *Mytilus Galloprovincialis* Lmk (Lamellibranch Mollusk): Influence of size and salinity. *Compte Rendu de Séance de la Société de Biologie*, **158**, 2125-2128.
- Lubet, P., and Streiff, W.,1982, Neuroendocrine control of reproduction in molluscs. *Journal of Physiology (Paris)*, **78**, 537-542.
- Massoulié, J. B., S.,1993, L'acétylcholinestérase : une structure originale pour une fonction vitale. *Annales de l'institut Pasteur, Actualité*, **4**, 35-49.
- Matthews, J. B. Celius, T, Halgren, R and Zacharewski, T,2000, Differential estrogen receptor binding of estrogenic substances: a species comparison. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **74**, 223-234.
- Matthiessen, P., Allen,Y.T, Allchin, C.R., Feist, S.W., Kirby, M.F., Law, R.J., Scott, A.P, Thain, J.E, and Thomas, K.V.,1998, Oestrogenic endocrine disruption in flounder (*Platichthys flesus* L) from United Kingdom estuarine and marine waters. *Science Series*.

Références bibliographiques

- Technical report*, **107**, CEFAS 48.
- Mazur, W.,1998, Phytoestrogen content in foods. *Baillieres Clinical Endocrinology Metabolisme*, **12**, 729-742.
- Mc Carthy, J.-F., and Shugart, L. R. 1990, *Biomarkers of environmental contamination*, (Boca Raton)
- Michel, X. R., Suteau, P., Robertson, L. W., and Narbonne, J.-F.,1993, Effects of benzo(a)pyrene, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl and 2,24,4',5,5'-hexachlorobiphenyl on the xenobiotic-metabolizing enzymes in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Aquatic Toxicology*, **27**, 335-344.
- Minier, C., Levy, F., Rabel, D., Bocquene, G., Godefroy, D., Burgeot, T., and Leboulenger, F.,2000, Flounder health status in the Seine Bay. A multibiomarker study. *Marine Environmental Research*, **50**, 373-377
- 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. *The Science of the Total Environment*, **73**, 189-201.
- Montagnani, M., Aldini, R., Roda, A., Caruso, M. L., Gioacchini, A. M., Lenzi, P. L., and Roda, E.,1996, Species differences in hepatic bile acid uptake: comparative evaluation of taurocholate and tauroursodeoxycholate extraction in rat and rabbit. *Comparative Biochemistry and Physiology* , **113 A**, 157-164.
- Monteverdi, G. H., and Di Giulio, R. T.,2000, Vitellogenin association and oocytic accumulation of thyroxine and 3, 5,3'-triiodothyronine in gravid *Fundulus heteroclitus*. *General and Comparative Endocrinology*, **120**, 198-211.
- Morin, B., Bubb, W. A., Davies, M. J., Dean, R. T., and Fu, S.,1998, 3-Hydroxylysine, a potential marker for studying radical-induced protein oxidation. *Chemistry and Research Toxicology*, **11**, 1265-1273.
- MPO,2002, Hareng du sud du golfe du Saint Laurent. *MPO-Sciences, Rapport sur l'état des stocks B3-01*, 4T.
- Mugiya, Y., and Tanahashi, A.,1998, Inhibitory effects of aluminium on vitellogenin induction by estradiol-17 beta in the primary culture of hepatocytes in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comaprative Endocrinology*, **109**, 37-43.
- Munkirritrick, K.R, Van Der Kraak, G.J, McMaster, M.E., and Portt, C.B., 1992, Responce of hepatic MFO activity and plasma sex steroids to secondary treatment of bleached Kraft pulp mill and mill shutdown. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **11**, 1427-1439.

Références bibliographiques

- Munkittrick, K.R, Van Der Kraak, G.J, McMaster, M.E., and Portt, C.B, Van Den Heuvel, M.R, and Servos, M.R, 1994, Survey of receiving water environmental impacts associated with discharges from pulp mills.2. Gonad size, liver size, hepatic EROD activity and plasma sex steroid levels in white sucker. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **13**, 1089-1101.
- Najimi, S., Bouhaimi, A., Daubeze, M., Zekhinini, 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.,1980, Time course of induction of microsomal enzymes following dietary administration of a PCB (DP6). *Toxicology and Applied Pharmacology*, **56**, 1-7.
- Narbonne, J.-F., Daubeze, M., Baumard, P., Budzinski, H., Clerandeu, C., Akcha, F., Mora, P., and Garrigues, P., 2001, Biochemicals markers in mussels, *Mytilus* sp. and pollution monitoring in European coasts: data analysis in *Biomarkers in Marine Organisms: a practical approach*, edited by P. B. Garrigues, H. Walker, H.C and Narbonne, J-F. Amsterdam: pp 216-238.
- Narbonne, J.-F., Daubeze, M., Clerandeu, 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.
- Narbonne, J. M. X.,1993, Use of biomarkers in assessment of contamination in marine ecosystems. Fundamental Approach and Applications, *MAP Technical Reports Series*, **71**, 1-20.
- Nash, J. P., Cuisset-Davail, B., Bhattacharyya, S., Suter H,C, Le Menn, F. & Kime, D.E.,2000, An enzyme linked immunosorbant assay (E.L.I.S.A.) for testosterone, estradiol, and 17,20b-dihydroxy-4-pregnene-3-one using acetylcholinesterase as tracer : application to measurement of diel patterns in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*.
- Nebret, D. W. N., D.R., 1991, P450 gene nomenclature based on evolution . In . in: *Methods and enzymology, Cytochrome P450, Waterman M.R. and Johnson E.F. (Eds)*, edited by London: pp 3-11.
- Neff, J.,1979., Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic anvironment. Sources, fates and biological affects. *Applied Science publishers Ltd. Ripples road, Barking, Essex, England*, . 262.
- Nimrod, A. C., and Benson, W. H.,1996, Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates. *Critical Reviews in Toxicology*, **26**, 335-364.
- Niyogi, S., Biswas, S., Sarker, S., and Datta, A. G.,2001, Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with

Références bibliographiques

- polyaromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research*, **52**, 13-26.
- OCDE (1997) Draft detailed review paper: appraisal of test methods for sex-hormone disrupting chemicals. OCDE Ed. 290 p.,
- 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.
- Parlenti, E.1990., Utilisation des hydrocarbures comme traceurs d'origine de la matière organique sédimentaire en milieu marin. Etude du Golf du Lion et du golfe de Gascogne (Programme Ecomarge). Doctorate Thesis, Université Bordeaux 1.
- Paulsen, C. A., Bermann, G., Wang, C.,(1996). Data from men in greater Seattle area reveals no downward trend in semen quality : further evidence that deterioration of semen quality is not geographically uniform. *Fertility and Sterility*., **65**, 1015-1020.
- Payne, J.,1976, Field evaluation of benzopyrene hydroxylase induction as a monitor for marine petroleum pollution. *Science*, **191**, 945-946.
- Payne, J., Fancey L. L., Rahimtula A. D. and Porter E. L.,1987, Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **86**, 233-245.
- Pelissero, C., Flouriot, G., Foucher, J. L., Bennetau, B., Dunogues, J., Le Gac, F., and Sumpter, J. P.,1993, Vitellogenin synthesis in cultured hepatocytes, an *in vitro* test for the estrogenic potency of chemicals. *Journal Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **44**, 263-272.
- Pelissero, C., Le Menn, F., and Kaushick, S.,1991, Estrogenic effect of dietary soya bean meal on vitellogenesis in cultured Siberian sturgeon *Acipenser baeri*. *General Comparative Endocrinology*, **83**, 447-457.
- Pellerin-Massicotte, J.,1994, Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine bivalves. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, **3**, 101-111.
- Perazzolo, L. M., Coward, K., Davail, B., Normand, E., Tyler, C. R., Pakdel, F., Schneider, W. J., and Le Menn, F.,1999, Expression and localization of messenger ribonucleic acid for the vitellogenin receptor in ovarian follicles throughout oogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biology of Reproduction*, **60**, 1057-1068.
- 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.
- Peters, L. D., Nasci, C., and Livingstone, D. R.,1998, Immunochemical investigations of cytochrome P450 forms/epitopes (CYP1A, 2B, 2E, 3A and 4A) in digestive gland of

Références bibliographiques

- Mytilus* sp. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, **121**, 361-369.
- Pereira, J.J., Ziskowski, J., Mercaldo-Allen, R., Kuropat, C., Luedke, D., and Gould, E., 1992, Vitellogenin in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from long island sound and Boston harbour. *Estuaries*, **15**, 289-297.
- Perera, F. P. , Rauh, V, W. Tsai, P. Kinney, D. Camann, D. Barr, T. Bernert, R. Garfinkel, Y. Tu, D. Diaz, J. Dietrich et R.M. Whyatt, 2003, Effects of transplacental exposure to environmental pollutants on birth outcomes in a multiethnic population. *Environmental Health Perspectives*, **111**, 201-205.
- Philipart, J. C., 1972., Age de croissance du chevine *Leuciscus cephalus* (L.) dans l'Ourthe et la Berwine. *Annales de la Société Royale de Zoologie, Belgique*, **102**, 47-81.
- 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.
- Pompella, A., Maelloaro, E., Casini, A.A., Farrali, M., Ciccoli, J.M., 1987, Measurement of lipid peroxydation *in vivo* : a comparaison of different procedures. *Lipids*, **22**, 206-211.
- 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.
- Prat, F., Coward, K., Sumpter, J. P., and Tyler, C. R., 1998, Molecular characterization and expression of two ovarian lipoprotein receptors in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biology and Reproduction*, **58**, 1146-1153.
- Purdom, C.E., Hardiman, P.A., Bye, V.J., Eno, N.C., Tayler, C.R., and sumpter, J.P., 1994, Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chemical Ecology*, **8**, 275-285.
- Ramade, F. 1979. « Ecotoxicologie », Masson édition., 228p.
- Ramon, M., and Amor, M. J. 2001. Increasing imposex in populations of *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae) in the north-western Mediterranean. *Marine Environmental Research*, **52** (5), 463-475.
- Ramos, I. N., May, M., and Ramos, K. S., 2001, Environmental health training of promotoras in colonias along the Texas-Mexico border. *American Journal of Public Health*, **91**, 568-570.
- Randerath, K. R., M, Gupta RC., 1981, 32P-postlabeling analysis for DNA damage. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*, **78**, 6126-6129.
- Regoli, F., and Principato, G., 1995, Glutathione, glutathione-dependant and antioxidant

Références bibliographiques

- nzymes in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metal under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquatic Toxicology*, **31**, 143-164.
- Reiner, E. A., WN.,1967, Effect of pH on inhibition and spontaneous reactivation of acetylcholinesterase treated with esters of phosphoric acids and of carbamic acids. *Biochemistry Journal*, 105.
- 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*,**95** (2),303-309
- Riffeser, M., and Hock, B.,2002, Vitellogenin levels in mussel hemolymph--a suitable biomarker for the exposure to estrogens? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **132**, 75-84.
- Rodriguez-Ariza, A., Martinez-Lara, E., Pascual, P., Pedrajas, J. R., Abril, N., Dorado, G., Toribio, F., Barcena, J. A., Peinado, J., Pueyo, C., and et al.,1993, Biochemical and genetic indices of marine pollution in Spanish littoral. *The Science of theTotal Environmental*, Suppl **1**, 109-16.
- Saliot, A. B., M., 1971.l'isolement de la progestérone et de quelques céstéroïdes de la partie femelle des gonades de la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus*. *Biochimie*,**53** (2),265-266
- Saltman, P.,1989, Oxidative stress: a radical view. *Seminars in Hematology*, **26**, 249-56.
- Sandoz Christine. Etudes de l'induction du cytochrome P450 et de la liaison au récepteur AH : Cas du carbaryl et de la dioxine, variable interspécifique., pp. 149. Bordeaux: Bordeaux1; 1999.
- Schmidt, G. H., and Ibrahim, N. M. M.,1994, Heavy metals content (Hg²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺) in various body parts: impact on cholinesterase activity and binding glycoproteins in the grasshopper *Aiolopus thalassinus* adultes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **29**, 149-164.
- Schrank, C. S., Cormier, S. M., and Blazer, V. S.,1997, Contaminant exposure, biochemical and histopathological biomarkers in white suckers from contaminated and reference sites in the sheboygan river, Wisconsin. *Journal of Great Lakes Research*, **23**, 119-130.
- Shakir, A. J., SK., Abdulah, M & Athar, M.,1996, Paraquat induced DNA damage by reactive oxygen species. *Biochemistry and Molecular Biology International* **39**, 63-67.
- Sheehan, D., and Power, A.,1999, Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology C*

Références bibliographiques

- Pharmacology Toxicology and Endocrinology*, **123**, 193-199.
- Siah, A., Pellerin, J., Benosman, A., Gagne, J.-P., and 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, E., and 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 Part C: Toxicology & Pharmacology*, **135** (2), 145-156.
- Son, M. H., and Hughes, R. N. 2000, Relationship Between Imposex and Morphological Variation of the Shell in *Nucella lapillus* (Gastropoda: Thaididae). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **50** (5), 599-606.
- Shigenaga, M. K., and Ames, B. N., 1991, Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of *in vivo* oxidative DNA damage. *Free Radical Biology and Medicine*, **10**, 211-216.
- Stegeman, J., 1992 . Nomenclature for hydrocarbon-inducible cytochrome P450 in fish. *Marine Environmental Research*, **34**, 133-138.
- Stegeman, J. J., Hahn, M. E., Weisbrod, R., Woodin, B. R., Joy, J. S., Najibi, S., and Cohen, R. A., 1995, Induction of cytochrome P4501A1 by aryl hydrocarbon receptor agonists in porcine aorta endothelial cells in culture and cytochrome P4501A1 activity in intact cells. *Molecular Pharmacology*, **47**, 296-306.
- Stott, G.G, Haensly, W.E., Neff, j.M., and Sharpe, J.R., 1983, Histopathologic survey of ovaries of plaice, *Pleuronectes platessa* L., from Aber Wrac'h and Aber Benoit, Brittany, France: Long term effects of the Amoco Cadiz crude oil spill. *Journal of Fish Diseases*, **6**, 429-437.
- Strand, J., and Asmund, G. 2003, Tributyltin accumulation and effects in marine molluscs from West Greenland. *Environmental Pollution* **123** (1), 31-37.
- Straw, J., and Rittschof, D. 2004. Responses of mud snails from low and high imposex sites to sex pheromones. *Marine Pollution Bulletin*, **48** (11-12), 1048-1054.
- Sumpter, J. P., and Jobling, S., 1993, Male sexual development in "a sea of oestrogen". *Lancet*, **342**, 124-125.
- Sunderman, F. M., A, Hopfer, SM, Zaharia, O, Reid MC., 1985, Increased lipid peroxidation in tissues of nickel chloride-treated rats. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, **15**, 229- 236.
- Takisawa, Y. 1970. Studies on the niigata episode of the minamata disease. *Acta Medecine*

Références bibliographiques

- Biology.*, **17**, 293-297.
- Tammes, P. D., A.,1956, Observations on the straining of suspensions by mussels. *Archives Neerlandaises de Zoologie.*, **11**, 87-112.
- Tanabe, S.,1988, PCB problems in the future: foresight from current knowledge. *Environmental Pollution*, **50**, 5-28.
- Tanabe, S. T., R.,1986., Distribution, behavior, and load of PCBs in the oceans. In. *PCBs and the environment I (J.S.Waid ed) CRC Press, Boca Raton, Florida*, 143-162.
- Thompson, S. B., H,2000, Determination of polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in environmental biological samples using focused microwave-assisted extraction. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry*, **76**, 49-60.
- Todorov, J. R., Elskus, A. A., Schlenk, D., Ferguson, P. L., Brownawell, B. J., and McElroy, A. E.,2002, Estrogenic responses of larval sunshine bass (*Morone saxatilis* x *M. chrysops*) exposed to New York City sewage effluent. *Marine and Environmental Research*, **54**, 691-695.
- Tomita, M.,1991, Comparison of one-electron reduction activity against the bipyridylum herbicides, paraquat and diquat, in microsomal and mitochondrial fractions of liver, lung and kidney (*in vitro*). *Biochemistry and Pharmacology*, **42**, 303-309.
- Tyler, C. R., Pottinger, T. G., Santos, E., Sumpter, J. P., Price, S. A., Brooks, S., and Nagler, J. J.,1996, Mechanisms controlling egg size and number in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biology Reproduction*, **54**, 8-15.
- Van Der Kaat, G.J, Munkittrick, K., McMaster, M., Prott, C.B., and Chang, JP,1992, Exposure to bleached kraft mill effluent disrupt the pituitary-gonadal axis of white sucker at multiple sites. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **115**, 224-233.
- Van der Oost, R., Vindimian, E., Van den Brink, P. J., Satumalay, K., Heida, H., and Vermeulin,1997, Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*): statistical analyses of relationships between contaminant exposure and biomarkers. *Aquatic Toxicology*, **39**, 45-75.
- Van Veld PA, W. D., Woodin BR.,1990, Induced cytochrome P450 in intestine and liver of spot *Leiostomus xanthurus* from a polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated environment. *Aquatic Toxicology*, **17**, 119-132.
- Vindimian, E. N., P, Migeon B et Garric J .1991, *In situ* pollution induced cytochrome P450 activity of freshwater fish : barbel (*Brbus barbuis*), Chub (*Leuciscus cephalus*) and nase (*Chondrostoma nasus*). *Aquatic Toxicology.*, **21**, 255-266.

Références bibliographiques

- Voogt, P. A., Broertjes, J. J. S., and Oudejans, R. C. H. M. 1985, Vitellogenesis in sea star: Physiological and metabolic implications. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **80** (2), 141-147.
- Voogt, P. A., den Besten, P. J., and Jansen, M. 1991, Steroid metabolism in relation to the reproductive cycle in *Asterias rubens* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **99** (1), 77-82.
- Vos, J. G. B., M. and b. C, Kruijt. . 1980. The a thymic nude rat. I. Morphology of lymphoik and endocrine organs. *Clinical Immunopathology*, **15**, 213-228.
- Vos, J.G., Dybing, E., Greim, H.A., Ladefoged, O., Lambré, C., Tarazona, J.V., Brandt, I. & Vethaak, A.D., 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the european situation. *Critical Reviews in Toxicology*, **30**(1): 71-133.
- Wallace, R. A. J., D.W., . 1968, Studies on amphibian yolk. VII. Serum phosphoprotein synthesis by vitellogenic females and estrogen-treated males of *Xenopus laevis*. *Canadian Journal of Biochemistry*, **46** (8), 953-959.
- White, R. H., ME, Lockhart, WL, Stegeman, JJ., 1994, Catalytic and immunochemical characterization of hepatic microsomal cytochromes P450 in beluga whale (*Delphinapterus leucas*). *Toxicology Appleid Pharmacology*, **126**, 45-57.
- Whitten, P. L., and Naftolin, F., 1992, Effects of a phytoestrogen diet on estrogen-dependent reproductive processes in immature female rats. *Steroids*, **57**, 56-61.
- WHO, 1986, International programme on chemical safety (IPCS): Carbamate pesticides . *Environmental Health Criteria 64: a general introduction Geneva, World Health Organization*, 137pp.
- WHO, 1993, International programme on chemical safety (IPCS). *Environmental Health Criteria 140: Polychlorinated biphenyls and terphenyls (second edition)*. Geneva, World Health Organization.
- Winston, G.W., and Di Giulio., R.T., 1991, Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, **19**, 137-161.

ANNEXES

ANNEXE 1 :

Fiches d'échantillonnage concernant l'étude de la biosurveillance du Bassin Adoure Garonne de Sud Ouest de France.

Fiche d'échantillonnage

Station	cours d'eau	date
Montespan	Garonne	09/08/01

espèce prélevée : Truite fario (*Salmo trutta fario*)

Description des poissons prélevés					Echantillons biochimie				Echantillons chimie					
Ind.	Taille (mm)	Poids (g)	Sexe	observations	6 marqueurs biochimiques				HAP PCB			metaux		pest.
					muscle	foie	enceph.	bile	muscle	foie	sedim.	muscle	sedim.	eau
1	279	182	F	nm ; kyste foie ; rr	OK	OK	OK	OK	OK	OK		OK		
2	275	199	M	R.A.S.	OK	OK	OK	OK	OK	OK		OK		
3	225	114	nd	R.A.S.	OK	OK	OK	Non	OK	OK		OK		
4	237	120	M	foie pâle	OK	OK	OK	OK	OK	OK		OK		
5	207	83	F	nm	OK	OK	OK	Non	OK	OK		OK		
6	273	209	M	R.A.S.	OK	OK	OK	OK	OK	OK		OK		
7	260	166	M	R.A.S.	OK	OK	OK	Non	OK	OK		OK		
8	276	174	M	rr	OK	OK	OK	OK	OK	OK		OK		
9	204	83	F	morte ; foie tacheté	OK	OK	OK	OK	OK	OK		OK		
10	226	110	F	morte	OK	OK	OK	OK	OK	OK		OK		
11	216	96	M	R.A.S.	-	-	-	-	OK	OK		-		
12	300	278		morte	-	-	-	-	OK	OK		-		
13	295	226		morte	-	-	-	-	OK	OK		-		
14	290	258		morte	-	-	-	-	OK	OK		-		
15					-	-	-	-	-	-	OK	-	OK	OK
n.échantillons					10	10	10	7	1	1	1	1	1	1
quantités unitaires appro					1g	1g	300 mg	100µl	50g	14g	500g	50g	100g	2,5l

nomenclature couleur stockage	
Foie	vert
Muscle	bleu
enceph.	rose
Bile	jaune

Tous les échantillons prélevés (sauf l'eau) ont été conservés dans la carboglace (-80°C) durant toute la durée de la mission. Dès l'arrivée au laboratoire, ils ont été placés dans les conditions de stockage habituelles (-80°C pour la biochimie, -20 et +4°C pour la chimie).

Fiche d'échantillonnage

Station	cours d'eau	date
St Andre de Lidon	La Seudre	10/09/01

espèce prélevée : chevine (*Leuciscus cephalus*)

Description des poissons prélevés					Echantillons biochimie				Echantillons chimie					
Ind.	Taille (mm)	Poids (g)	Sexe	observations	6 marqueurs biochimiques				HAP PCB			metaux		pest. eau
					muscle	foie	enceph.	bile	muscle	foie	sedim.	muscle	sedim.	
1	215	80	nd	ras	ok	ok	ok	ok	ok	non		ok		
2	248	124	M	Ac.	ok	ok	ok	ok	ok	ok		ok		
3	236	116	M	ras	ok	ok	ok	ok	ok	ok		ok		
4	238	140	F	Ac.	ok	ok	ok	ok	ok	ok		ok		
5	250	144	M	Mi.	ok	ok	ok	ok	ok	ok		ok		
6	226	111	M	Ac.	ok	ok	ok	ok	ok	ok		ok		
7	240	130	F	tum ov.	ok	ok	ok	non	ok	ok		ok		
8	215	97	M	Ky.	ok	ok	ok	ok	ok	non		ok		
9	246	146	nd.	Ac.	ok	ok	ok	ok	ok	ok		ok		
10	228	109	M	Ac.	ok	ok	ok	ok	ok	ok		ok		
11	256	172	M	RAS				ok		ok				
12	220	111	M	Ac.						ok				
13	209	95	M	Ky. Ovaires						ok				
14	228	102	M	ras						ok	ok		ok	ok
15	240	124	M	ras						ok				
16	236	124	M	ras						ok				
17	253	155	M	ras						ok				
18	220	104	M	ras						ok				
n.échantillons					10	10	10	5	1	1	1	1	1	1
quantités unitaires approx					1g	500 mg	300 mg	150µl	50 g	12g	500 g	50 g	100 g	2,5 l

nomenclature couleur stockage	
Foie	vert
Muscle	bleu
enceph.	rose
Bile	jaune

Station	cours d'eau	date
Pareloup La Capelle Viaur	Viaur	04/10/01

espèce prélevée : chevaine (Leuciscus cephalus)

Description des poissons prélevés					Echantillons biochimie				Echantillons chimie					
Ind.	Taille (mm)	Poids (g)	Sexe	observations	6 marqueurs				HAP PCB			metaux		pest. eau
					muscle	foie	enceph.	bile	muscle	foie	sedim.	muscle	sedim.	
1	242	151	M	RAS	ok	ok	ok	non	ok	ok		ok		
2	264	177	M	RAS	ok	ok	ok	ok	ok	ok		ok		
3	227	104	M	RAS	ok	ok	ok	ok	ok	ok		ok		
4	255	160	M	RAS	ok	ok	ok	ok	ok	ok		ok		
5	235	120	M	RAS	ok	ok	ok	ok	ok	ok		ok		
6	180	245	F	RAS	ok	ok	ok	ok	ok	ok		ok		
7	235	129	M	RAS	ok	ok	ok	ok	ok	ok		ok		
8	280	235	M	RAS	ok	ok	ok	ok	ok	ok		ok		
9	283	226	F	RAS	ok	ok	ok	ok	ok	ok		ok		
10	265	217	M	RAS	ok	ok	ok	non	ok	ok		ok		
11	275	206	M	RAS						ok				
12	286	217	F	RAS						ok				
13	266	171	M	traumatisme				ok		ok				
14														
15														
16														
17														
18														
n.échantillons					10	10	10	5	1	1	1	1	1	1
quantités unitaires approx.					1g	500 mg	300 mg	150µl	50 g	8g	500 g	50 g	100 g	2,5 l

nomenclature couleur stockage	
Foie	vert
Muscle	bleu
enceph	rose
Bile	jaune

ANNEXE 2 :

**Données chimiques de l'étude de biosurveillance du
Bassin Adour Garonne de Sud Ouest de France**

Pesticides	Sites de prélèvements											
	ng/litre	Capelle V	St André	La Garde	Lahontan	Tauriac	Pareloup	Clarac	Millau	Montespan	Pareloup	Bourret
Atrazine	8,4	68,7	23,6	27,7	8,9	12,2	2,6	1,6	6,4	9,8	39,1	19,7
Desethylatrazine	5,3	195,3	17,4	16,3	5,0	5,6	2,3	1,4	3,4	0,0	36,1	9,5
Simazine	1,7	50,5	6,4	7,3	1,8	0,0	1,1	2,0	2,8	0,0	11,2	4,7
Desethylsimazine	0,0	44,4	0,0	0,0	5,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0
Carbofuran	1,0	2,6	2,6	3,7	1,0	0,0	1,2	1,7	0,0	0,6	2,1	1,0
Carbaryl	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,7	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0
somme	16,4	361,4	50,0	55,0	21,9	17,7	11,8	7,3	12,6	10,4	88,4	35,9

Dosage des polychlorobiphényles dans les sédiments des sites de prélèvements
en ng/ g de matière sèche

Conc. ng/g	La Garde	Lahontan	Rabastens	Montespan	Pareloup	Le Fleix	St André	Tauriac	Bourret	Capelle V	Clarac	Millau	Muret
28	0,33	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,21	0,61	<0,1	0,13	<0,1	<0,1	<0,1
52	0,28	0,29	2,75	1,37	0,98	0,30	1,64	0,71	0,89	1,46	0,40	0,55	2,00
101	6,59	0,61	4,86	2,97	2,53	0,71	2,42	0,52	1,29	7,45	0,83	0,75	4,99
118	0,46	2,89	0,63	0,58	0,32	0,19	0,54	0,09	1,36	3,75	0,64	0,62	0,92
153	0,86	6,18	1,06	0,67	0,25	0,66	2,00	0,19	0,81	16,45	0,88	0,55	0,96
138	0,45	5,78	0,53	0,35	0,89	0,40	1,59	0,06	0,85	20,83	0,91	0,57	0,79
180	0,60	3,42	1,27	0,81	0,62	0,38	1,83	0,13	0,18	13,98	0,44	0,14	0,78
Somme	10	19	11	7	6	3	10	2	5	64	4	3	10

Dosage des polychlorobiphényles dans les foies des poissons
en ng/ g de matière sèche

Conc. ng/g	Pareloup	St André	Le Fleix	La Garde	Lahontan	Tauriac		Pareloup	Clarac	Millau	Montespan		Pareloup	Bourret	Rabastens
28	0,94	0,10	0,14	0,40	0,00	0,16		0,00	0,38	0,00	0,36		0,85	1,86	0,14
52	2,20	1,73	2,30	2,13	4,18	1,32		1,02	5,44	0,80	13,00		2,19	5,78	2,73
101	4,50	5,83	5,60	3,86	17,12	3,62		6,28	26,61	2,92	26,63		3,24	23,35	6,81
118	5,84	7,12	4,42	4,35	14,30	4,53		6,14	26,12	3,32	30,00		3,85	21,89	5,46
153	11,00	3,56	13,41	6,85	41,08	30,47		8,05	33,30	8,35	36,15		2,10	57,59	10,59
138	9,06	12,19	10,71	5,91	29,93	16,97		7,32	35,15	6,63	41,47		7,31	52,64	9,24
180	2,94	9,80	4,42	2,45	18,79	18,14		1,09	11,43	3,68	11,89		0,00	22,76	2,93
Somme	36	40	41	26	125	75		30	138	26	160		20	186	38

Dosage des polychlorobiphényles dans les muscles des poissons
en ng/ g

Conc. ng/g	Pareloup	St André	Le Fleix	La Garde	Lahontan	Tauriac	Pareloup	Clarac	Millau	Montespan	Pareloup	Bourret	Rabastens
28	2,16	0,37	1,30	5,13	2,67	0,69	0,29	1,31	0,33	3,21	0,79	11,20	2,81
52	3,04	2,46	10,46	15,22	10,72	2,73	2,94	4,88	8,27	5,50	4,04	24,27	20,53
101	9,40	14,45	18,58	34,79	28,50	10,67	10,03	14,25	13,91	9,78	23,29	4,05	36,60
118	10,18	6,11	15,68	37,38	30,15	11,83	7,84	12,83	15,21	23,88	26,98	0,99	28,72
153	21,14	43,69	57,32	61,01	91,31	60,70	11,94	0,15	20,43	42,29	57,84	0,84	49,39
138	16,76	30,20	41,87	53,26	65,55	37,59	9,59	22,12	18,71	8,50	49,89	0,90	46,29
180	7,00	25,63	18,00	24,37	48,77	34,98	2,27	9,56	8,67	2,16	0,82	0,49	16,96
Somme	70	123	163	231	278	159	45	65	86	95	164	43	201

Dosage des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques dans les sédiments
en ng/ g de matière sèche

HAP	Le Fleix	La Garde	Montespan	Rabastens	Bourret	CapelleV	Millau	Tauriac	St André	Clarac	Lahontan	Pareloup	Muret
Phénanthrène	14,9	6,9	31,6	28,1	4,1	23,2	21,2	7,3	13,3	176,8	97,5	4,4	9,3
Anthracène	4,0	3,0	2,1	20,8	<0,5	10,8	<0,5	0,8	2,6	72,0	13,9	0,5	1,3
Fluoranthène	52,2	19,5	50,6	108,9	4,4	76,2	39,5	18,8	42,4	285,2	193,7	8,8	20,0
Pyrène	40,3	16,6	37,8	81,5	3,5	58,6	30,6	14,3	34,5	200,0	306,6	6,3	15,9
Benz(a)Anthracène	29,9	39,7	15,3	66,1	1,7	58,3	19,0	9,2	20,7	157,8	21,6	2,0	8,2
Chrysène(+ triphénylène)	31,4	84,5	28,7	64,3	2,8	62,0	24,6	10,2	28,6	163,3	35,1	5,6	15,4
Benzo(b+k+j)Fluoranthènes	57,2	110,7	49,2	78,0	2,6	96,1	39,8	21,0	51,2	201,3	72,9	11,4	28,2
Benzo(e)Pyrène	21,4	40,5	17,9	31,6	1,6	41,4	18,1	7,8	24,2	81,6	48,9	4,3	13,9
Pérylène	8,5	13,4	5,5	14,5	<0,2	14,8	4,8	2,4	37,7	30,9	10,5	4,7	4,1
Benzo(a)Pyrène	28,2	51,6	21,9	51,8	0,2	57,6	21,3	10,3	26,0	123,6	58,5	5,5	16,2
Indéno(123-cd)Pyrène	22,3	34,0	18,8	27,9	1,4	42,7	17,4	7,6	58,4	87,4	70,4	4,5	14,4
Benzo(ghi)Pérylène	19,3	32,0	17,8	24,7	0,7	33,6	18,8	7,0	19,1	65,2	19,7	4,4	14,8
Dibenz(ah)anthracène	4,7	8,2	2,8	7,0	0,05	11,0	3,2	1,3	7,1	22,9	3,7	0,7	2,1
Somme	334	461	300	605	23	586	258	118	366	1668	953	63	164

Dosage des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques dans les foies des poissons
en ng/ g

HAP	Pareloup	St André	Le Fleix	La Garde	Lahontan	Tauriac	Pareloup	Clarac	Millau	Montespan	Pareloup	Bourret	Rabastens
Phénanthrène	4,7	8,0	13,2	15,1	55,5	14,4	9,1	4,8	7,2	6,4	10,5	9,6	16,1
Anthracène	0,4	0,0	0,0	1,2	0,0	1,1	1,2	0,7	0,3	0,0	1,2	0,0	0,0
Fluoranthène	1,0	0,7	9,1	3,2	38,1	2,7	1,6	1,9	1,3	1,4	1,1	1,6	5,1
Pyrène	1,0	1,9	5,3	3,7	33,7	2,0	3,2	1,0	0,9	2,7	3,3	0,3	2,6
Benz(a)Anthracène	0,2	0,9	0,3	0,1	0,2	0,1	0,6	0,1	0,3	0,2	0,7	1,0	0,0
Chrysène(+ triphénylène)	0,4	0,2	0,3	0,5	0,2	0,2	0,3	0,5	0,4	0,4	0,5	0,5	0,0
Benzo(b+k+j)Fluoranthènes	0,3	3,3	1,9	5,1	4,9	0,2	11,2	3,3	0,7	9,8	2,9	3,2	3,5
Benzo(e)Pyrène	0,4	1,8	1,2	2,4	0,1	0,0	2,3	0,4	0,2	2,5	1,7	1,4	2,8
Pérylène	0,0	0,9	0,3	0,6	0,2	0,1	0,4	0,0	0,2	0,6	1,0	0,5	0,0
Benzo(a)Pyrène	0,1	0,9	0,5	0,9	0,2	0,0	3,3	0,1	0,1	1,7	0,5	0,7	1,5
Indéno(123-cd)Pyrène	0,5	1,1	0,4	0,9	1,0	0,0	1,0	0,3	1,1	0,8	1,4	1,1	0,8
Benzo(ghi)Pérylène	1,4	2,0	1,2	2,3	0,7	1,0	1,3	0,9	1,4	1,1	1,5	2,0	2,2
Dibenz(ah)anthracène	0,1	0,4	0,3	3,1	0,0	0,1	0,6	0,3	0,5	0,5	0,2	0,8	0,6
Somme	11	22	34	39	135	22	36	14	15	28	27	23	35

**Dosage des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
dans les muscles des poissons en ng/ g**

HAP	Capelle V	St André	Le Fleix	La Garde	Lahontan	Tauriac	Pareloup	Clarac	Millau	Montespan	Capelle V	Bourret	Rabastens
Phénanthrène	2,69	1,90	3,82	3,42	25,87	2,11	2,24	13,10	3,45	8,53	2,95	7,15	4,57
Anthracène	0,14	0,08	<0,05	0,77	1,43	0,05	0,17	<0,02	<0,05	0,93	<0,05	0,30	0,78
Fluoranthène	0,58	0,35	1,93	1,65	10,70	0,50	0,53	2,42	0,66	1,67	0,98	1,76	1,23
Pyrène	1,33	0,50	4,74	2,44	12,68	0,89	1,49	1,57	0,42	1,59	2,03	1,78	1,24
Benz(a)Anthracène	<0,05	0,06	0,24	0,28	0,02	0,11	<0,05	0,26	0,22	0,24	0,22	0,06	0,24
Chrysène(+ triphénylène)	0,15	0,12	0,56	0,51	0,03	0,14	0,14	0,32	0,12	0,11	0,58	0,18	0,54
Benzo(b+k+j)Fluoranthènes	<0,05	0,12	0,17	<0,05	0,02	0,24	0,15	0,08	0,22	0,23	0,31	0,28	0,25
Benzo(e)Pyrène	<0,05	0,06	0,33	<0,05	0,09	<0,05	0,05	<0,05	0,09	0,30	0,61	0,11	0,84
Pérylène	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	0,18	<0,05	<0,05	0,32	<0,05	<0,05	<0,05	0,14	<0,05
Benzo(a)Pyrène	<0,05	<0,05	0,31	<0,05	0,05	<0,05	0,05	0,09	0,11	0,10	0,16	0,09	<0,05
Indéno(123-cd)Pyrène	0,17	<0,05	<0,05	0,09	0,18	0,22	<0,05	0,13	0,05	0,29	0,87	0,15	<0,05
Benzo(ghi)Pérylène	0,19	0,13	0,14	0,12	0,21	0,41	0,10	0,45	0,08	0,43	0,53	0,15	0,39
Dibenz(ah)anthracène	0,02	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	0,19	<0,05	0,06	0,08	<0,05	<0,05
Somme	5,27	3,31	12,24	9,30	51,47	4,66	4,92	18,93	5,42	14,47	9,33	12,15	10,07

Métaux dans les sédiments de 9 sites de prélèvements

Sites	Manganèse	Fer	Cobalt	Nickel	Cuivre	Zinc	Arsenic	Sélénium	Cadmium	Plomb	Total
<i>Pareloup</i>	299,00	11513	2,66	5,61	9,13	52,63	9,27	2,97	0,45	33,89	11928,61
<i>Le Fleix</i>	561,00	25014	8,14	15,56	12,15	69,10	12,54	4,24	0,79	46,35	25743,87
<i>La Garde</i>	435,00	10651	3,51	7,69	8,63	58,93	11,33	2,55	0,45	33,80	11212,89
<i>Lahontan</i>	1020,00	36302	13,41	31,42	38,20	338,00	21,36	2,96	1,30	86,72	37855,37
<i>Bourret</i>	380,00	10869	3,83	9,92	7,85	42,94	8,33	2,48	0,44	22,02	11346,81
<i>Rabastens</i>	361,00	15538	2,91	5,61	6,73	51,82	7,25	4,00	0,52	37,92	16015,76
<i>Clarac</i>	726,00	51669	15,06	40,21	26,09	191,12	29,13	4,05	0,80	52,14	52753,60
<i>Millau</i>	41,72	327	22721	6,65	19,77	28,21	104,00	18,47	1,24	51,21	23319,27
<i>Montespan</i>	96,57	636	45412	14,08	51,28	20,60	214,00	22,79	1,68	44,28	46513,28

Métaux dans les foies des 3 espèces de poissons

en μg par g de poids sec

Chevaine	Manganèse	Fer	Cobalt	Nickel	Cuivre	Zinc	Arsenic	Sélénium	Cadmium	Plomb	Total
<i>Pareloup</i>	13,96	665,0	0,30	0,44	40,85	143,77	1,27	14,36	0,10	0,99	881,04
<i>St-André</i>	10,64	652,9	0,30	1,34	60,45	155,73	1,33	17,10	0,09	1,02	900,94
<i>Le Fleix</i>	5,59	293,0	0,34	0,20	42,14	100,90	1,82	15,41	0,10	0,83	460,33
<i>La Garde</i>	15,36	326,5	0,48	0,23	63,86	139,94	2,62	12,12	0,12	1,58	562,80
<i>Lahontan</i>	6,46	557,9	0,71	0,35	449,97	103,18	1,26	35,93	0,10	0,87	1156,76
Barbeau											
<i>Pareloup</i>	20,42	1570,0	0,34	0,71	42,79	74,30	1,42	10,90	0,13	0,85	1721,86
<i>Bourret</i>	7,43	632,0	0,34	0,11	64,31	76,82	1,62	15,84	0,12	0,93	799,52
<i>Rabastens</i>	15,01	462,7	0,36	0,77	80,62	87,66	1,73	18,03	0,11	0,99	667,94
Truite											
<i>Pareloup</i>	9,49	608,0	0,39	5,30	457,46	107,88	1,57	22,87	0,12	1,09	1214,17
<i>Clarac</i>	6,31	476,0	0,69	0,34	258,37	85,41	1,58	26,36	0,11	0,87	856,04
<i>Millau</i>	6,98	817,7	0,48	0,21	464,95	157,70	1,36	24,42	0,13	0,96	1474,92
<i>Montespan</i>	11,01	293,0	0,29	1,08	63,74	123,31	1,81	26,30	0,10	0,94	521,53

Métaux dans les muscles des 3 espèces de poissons

en µg par g de poids sec

Chevaîne	Manganèse	Fer	Cobalt	Nickel	Cuivre	Zinc	Arsenic	Sélénium	Cadmium	Plomb	Total
<i>Pareloup</i>	2,52	<10	0,16	1,60	2,71	24,80	1,28	0,65	0,08	0,05	33,85
<i>St-André</i>	2,07	40,04	0,15	2,30	2,40	31,55	1,23	1,68	0,08	0,04	81,54
<i>Le Fleix</i>	2,76	60,67	0,19	9,60	2,68	43,34	1,39	1,20	0,08	0,05	121,96
<i>La Garde</i>	2,11	57,16	0,19	10,30	4,00	40,03	1,46	1,50	0,09	0,05	116,89
<i>Lahontan</i>	1,79	<10	0,17	3,50	2,67	52,73	1,65	1,11	0,08	0,05	63,75
<i>Tauriac</i>	2,35	48,86	0,16	1,30	2,27	39,59	1,20	1,01	0,08	0,04	96,86
Barbeau											
<i>Pareloup</i>	7,90	68,76	0,16	0,08	2,38	19,56	1,25	1,11	0,08	0,05	101,33
<i>Bourret</i>	4,13	49,78	0,17	0,80	2,43	16,86	1,49	1,30	0,08	0,05	77,09
<i>Rabastens</i>	4,35	42,73	0,16	2,20	2,12	16,64	1,28	1,50	0,08	0,05	71,11
Truite											
<i>Pareloup</i>	1,27	42,65	0,17	2,40	2,45	22,05	1,30	1,05	0,08	0,05	73,47
<i>Clarac</i>	1,30	45,48	0,24	2,90	2,31	15,39	1,20	1,60	0,08	0,06	70,56
<i>Millau</i>	0,70	33,50	0,20	1,40	2,13	18,53	1,15	1,10	0,08	0,06	58,85
<i>Montespan</i>	1,16	36,60	0,25	2,00	2,22	18,56	1,24	1,10	0,80	0,05	63,98

Les biomarqueurs chez les poissons et les bivalves: de l'exposition à l'effet et du laboratoire au terrain

Le travail présenté ici concerne les différentes étapes du développement et de la validation des biomarqueurs appliqués aux stratégies d'évaluation et de surveillance biologique de la pollution des milieux aquatiques. Pour ce qui concerne les biomarqueurs d'exposition déjà développés au laboratoire, le travail a consisté à valider les approches multimarqueurs et faciliter l'interprétation des données pour les gestionnaires des risques de l'environnement. Les études ont été réalisées dans le cadre du programme européen BEEP pour le milieu marin (moule comme espèce sentinelle) et dans le cadre du programme de l'Agence Adour Garonne FISHBIO pour le milieu dulçaquicole (trois espèces de poissons comme espèces sentinelles).

Pour ce qui concerne les biomarqueurs d'effets nous avons utilisé deux méthodes d'évaluation dont la première est une étude *in vitro* (culture d'hépatocytes de truite arc-en-ciel, fractions subcellulaires). La seconde est une expérimentation *in vivo* en aquarium chez la moule et le turbot : exposition à un pétrole brut de la Mer du Nord et à un mélange de pétrole brut + HAP + alkylphénol afin d'étudier les variations des stéroïdes dans le plasma et les anomalies histologiques au niveau de certains organes, ainsi que la mise en évidence la relation entre les deux approches pour les deux modèles utilisés.

Mots-clés : biomarqueurs d'exposition, biomarqueurs d'effets, indice de pollution, poisson, bivalves, perturbateurs endocriniens, potentiel oestrogénique, stéroïdes plasmatiques, histopathologie.

The analysis of biomarkers in fish and molluscs: from the exposure to effects and the laboratory to field

This work relates the different steps used to develop and validate biological markers for biomonitoring, and environmental pollution assessment. Although biomarkers of exposure have been already well-studied in our laboratory, the aim of the present work was to validate their use in multimarker approaches and facilitate their interpretation for routine environmental risk assessment. The studies were carried out within the framework of the European program BEEP for the marine environment (mussels as sentinel species) and within the framework of the program of the Adour Garonne water agency : FISHBIO for freshwater ecosystems (three fish species).

Concerning biomarkers of effects, two methods of evaluation were applied : an *in vitro* study on cultured rainbow trout hepatocytes and an *in vivo* experiment consisting in an exposure of mussel and turbot to North Sea Oil (NSO) and to a mixture of NSO + PAHs + alkylphenol in aquaria in order to study the variations of the plasmatic steroids and the histological abnormalities in the liver and the gonads, and to provide a link between these two types of approaches for the two models (bivalves and fish).

Keys words : biomarkers of exposure, biomarker of effects, pollution index, fish, molluscs, endocrine disrupters, estrogenic potency, plasmatic steroids, histopathology.