

MANUEL SUR LES BIOMARQUEURS RECOMMANDES POUR LE PROGRAMME DE BIOSURVEILLANCE DU MED POL

PREFACE

L'objectif de ce manuel est de servir de document technique de base à des laboratoires désireux de mettre en place une surveillance en routine des effets biologiques de la pollution. Un certain nombre de biomarqueurs ont été traités dans ce manuel, en commençant par ceux permettant de donner une indication générale sur un stress biologique dû à la pollution. Ces biomarqueurs de stress (*indices de stress général*) comprennent l'évaluation de l'altération des composants génétiques et subcellulaires. L'élévation de l'activité enzymatique du système oxygénase à fonction mixte (MFO) et l'induction de la synthèse des protéines métallothionéines (MT) aussi appelés biomarqueurs d'exposition (*indices de stress spécifique*) sont également traités.

L'utilisation potentielle de ces deux derniers biomarqueurs est importante, dans la mesure où ils peuvent montrer une réponse cellulaire aux métaux lourds (MT) et aux composés xénobiotiques organiques aromatiques (MFO), qui sont tous deux considérés comme les principaux polluants des zones côtières. De tels biomarqueurs semblent offrir la meilleure information sur la réponse biologique des animaux à ces deux classes de polluants toxiques, et se présentent donc comme des signaux d'alerte précoce indiquant que l'environnement est en train de subir une détérioration. Ils ont été caractérisés de façon rigoureuse chez plusieurs organismes marins et se sont révélés être adaptés pour identifier une réponse biologique induite sous les effets de polluants chimiques. Cependant, en raison de la nature complexe de ces réponses biologiques, une grande prudence doit être de rigueur lors de l'interprétation des résultats de surveillance à partir de stations de terrain. Ces réponses doivent être évaluées en fonction de l'état physiologique des organismes tests au moment de l'échantillonnage, ce qui peut être vérifié en mesurant les deux indices de stress général cités plus haut (altération génétique et altération de l'activité lysosomale). Ce manuel tente également de mettre en évidence un certain nombre de pièges techniques et lorsque c'est possible suggère comment améliorer la validité des résultats de biosurveillance.

Note importante sur la sécurité

La sécurité mérite une attention spéciale. La plupart des produits chimiques et de l'équipement énumérés dans les sections suivantes sont relativement inoffensifs à condition de les utiliser de façon convenable. Si possible des articles jetables doivent être utilisés comme par exemple les gants, les blouses et les containers spéciaux pour l'élimination des déchets de produits cancérigènes.

Remerciements

Le premier avant-projet de ce manuel a été préparé par M. Charles Galdies, Centre Euro-méditerranéen sur la Dynamique Côtière Insulaire (IcoD), Fondation pour les Etudes Internationales, Université de Malte. Plusieurs scientifiques méditerranéens dont le Professeur A. Viarengo de l'Université de Gênes, Italie, le Dr. Claudia Bolognesi de l'Institut sur les Tumeurs de Gênes, Italie, et le Dr Sylvie

Tambutté de la Direction de l'Environnement, de l'Urbanisme et de la Construction, Principauté de Monaco, ont fourni des commentaires qui ont tous été insérés dans ce document. Le PNUE/PAM se félicite de la coopération instaurée avec l'Accord RAMOGE qui a permis de compléter le présent manuel par une cassette vidéo illustrant les techniques employées. Le PNUE/PAM remercie chacun pour sa coopération.

La traduction en français du manuel dans sa version intégrale a été réalisée par le Dr Sylvie Tambutté, Division Patrimoine et Milieux de la Direction de l'Environnement, de l'Urbanisme et de la Construction, Principauté de Monaco.

TABLE DES MATIÈRES

	<u>Page No.</u>
1. INTRODUCTION	49
1.1 Processus mutagènes	49
1.2 Lésions cytoplasmiques	50
1.3 <i>Altération des voies biochimiques normales</i>	51
1.3.1 Induction du système mono-oxygénase dépendant du cytochrome P450	51
1.3.2 <i>Augmentation des niveaux cytosoliques des protéines liant les métaux</i>	52
1.4 Utilisation de réponses sub-léthales comme outils de diagnostic	53
1.4.1 Critères de surveillance et obtention d'échantillons	53
1.4.2 Choix des espèces	53
1.4.3 Interprétation des résultats : quelques considérations pratiques	55
1.4.4 Effets dus à des mélanges complexes de polluants	56
1.5 Conclusion	58
2. ÉVALUATION DE LA STABILITÉ LYSOSOMALE MEMBRANAIRE	58
2.1 Généralités	58
2.2 Évaluation de la stabilité lysosomale membranaire : test cytochimique sur des coupes congelées	59
2.2.1 Principe	59
2.2.2 Produits chimiques et solutions	59
2.2.3 Préparation du tissu	60
2.2.4 Détermination enzymatique de la stabilité membranaire	60
2.2.5 <i>Interprétation des résultats</i>	61
2.3 Détermination de la stabilité lysosomale membranaire dans des cellules vivantes : test de rétention du rouge neutre	63
2.3.1 Produits chimiques et solutions	63
2.3.2 Évaluation pratique	64

3. ÉVALUATION DES EFFETS GÉNOTOXIQUES	65
3.1 Méthode d'élution alcaline sur filtre	65
3.1.1 Équipement	65
3.1.2 Produits chimiques et solutions	65
3.1.3 Préparation des échantillons à partir des tissus d'organismes aquatiques	67
3.1.3.1 Foie de poisson	67
3.1.3.2 Cellules de branchie de moule	67
3.1.3.3 Hémolymphe de moule	67
3.1.4 Mise en place de l'échantillon	67
3.1.5 Lyse des cellules	68
3.1.6 Elution du simple brin d'AND	68
3.1.7 Détermination microfluorimétrique de l'AND	68
3.1.8 Calculs	68
3.1.8.1 Calcul de la pente des courbes d'élution (taux d'élution)	68
3.1.8.2 Calcul du Facteur de Scission du Brin (SSF)	69
3.2 Détermination de la fréquence des micronoyaux	71
3.2.1 Généralités	71
3.2.2 Équipement	71
3.2.3 Produits chimiques et solutions	71
3.2.4 Méthode	72
3.2.4.1 Préparation de la suspension cellulaire	72
3.2.4.2 Préparation des lames	72
3.2.4.3 Comptage des lames	72
4. ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ DES OXYDASES À FONCTION MIXTE	73
4.1 Généralités et principe	73
4.1.1 Échantillonnage	73
4.1.2 Équipement	74
4.1.3 Produits chimiques et solutions	75
4.1.4 Préparation des échantillons pour l'analyse	75

	<u>Page No.</u>
4.1.4.1 Dissection du tissu et préparation pour l'analyse	76
4.1.4.2 Homogénéisation du tissu	76
4.1.4.3 Préparation de la fraction S9 et du culot 100,000xg (microsomes)	76
4.1.5 Détermination de la concentration en protéines	77
4.1.6 Détermination de l'éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD)	77
4.1.6.1 Préparation	77
4.1.6.2 Réaction enzymatique	77
4.1.6.3 Quantification de la résorufine produite	78
4.1.7 Calcul de l'activité	78
4.1.8 Interprétation des résultats	79
4.1.9 Développements futurs	79
5. ÉVALUATION DU NIVEAU DE MÉTALLOTHIONEINES (MT)	80
5.1 Généralités	80
5.2 Détermination spectrophotométrique des groupes SH avec le réactif d'Ellman	81
5.2.1 Principe	81
5.3 Évaluation pratique	81
5.3.1 Équipement	82
5.3.2 Produits chimiques et solutions	82
5.3.3 Préparation des échantillons et de la fraction enrichie en MT	83
5.3.3.1 Homogénéisation	83
5.3.3.2 Centrifugation	83
5.3.3.3 Précipitation éthanolique	83
5.3.3.4 Remise en suspension de la fraction enrichie en MT	84
5.3.4 Réaction avec le DTNB (réaction d'Ellman)	84
5.3.4.1 Courbe standard de référence glutathion	84
5.3.4.2 Détermination spectrophotométrique des MT	84
5.3.5 Calcul et interprétation des résultats	85
5.3.5.1 Tracé de la courbe standard	85
5.3.5.2 Détermination quantitative du contenu en MT	85
6. BIBLIOGRAPHIE	86

1. INTRODUCTION

Lors de l'exposition à des contaminants nocifs, les organismes manifestent plusieurs symptômes indicateurs d'une altération biologique, les premiers apparaissant rapidement au niveau subcellulaire. Ces effets "subléthaux", lorsqu'ils sont intégrés, aboutissent souvent à un mal visible au niveau de l'organisme et de la population entière, à un stade où il est trop tard pour limiter l'ampleur de l'altération biologique résultant de la détérioration de l'environnement.

La plupart de ces symptômes ont pu être reproduits en laboratoire et les différents mécanismes biologiques de réponse aux xénobiotiques principaux sont maintenant bien compris. L'utilisation de biomarqueurs¹ est devenue une pratique courante chez les écotoxicologistes qui utilisent ces réponses comme des outils d'alerte précoce de surveillance d'une pollution, permettant de signaler l'apparition d'effets nocifs aux niveaux cellulaire et subcellulaire. La discussion suivante décrit brièvement plusieurs effets subléthaux présentés par des organismes marins ainsi que leur usage correct en tant que biomarqueurs de perturbation biologique résultant d'une pollution marine.

1.1 Processus mutagènes

Les processus anormaux de replication et de transcription d'ADN ainsi que ceux de traduction d'ARN (Eichorn, 1973) représentent souvent les symptômes qui font suite à l'interaction entre les xénobiotiques et le matériel nucléaire. Des études *in vitro* montrent que les métaux lourds, par exemple, peuvent facilement altérer la capacité des acides nucléiques à lier l'hydrogène complémentaire et donc faciliter l'apparition des processus précités.

Les sous-produits métaboliques dérivés de xénobiotiques bioaccumulés peuvent aussi engendrer des effets négatifs sur l'intégrité du matériel génétique. Dans les cellules eucaryotes, les xénobiotiques organiques sont biotransformés en plusieurs métabolites mutagènes et carcinogènes par les enzymes du cytochrome P450 et par la fonction époxyde hydratase (voir 1.3 ci-dessous). Ces métabolites sont des sous-produits très réactifs ayant une affinité pour les sites nucléophiles des macromolécules cellulaires comme l'ADN. L'interaction de ces substances réactives avec l'ADN peut conduire à la formation de lésions de l'ADN. Sauf cas d'inhibition par certains types de contaminants comme les métaux lourds, des enzymes nucléaires spécialisées sont capables de corriger ces lésions en minimisant donc une mauvaise expression du génome. Une réparation non efficace du génome caractérise aussi l'une des premières étapes conduisant à la carcinogénèse chimique et à la malignité. De tels processus détectés dans les tissus reproducteurs des organismes marins pourraient avoir des conséquences sérieuses puisque cela affecterait de façon négative leur capacité reproductrice.

¹ Deux autres catégories font aussi partie de la surveillance des effets biologiques :
(1) les tests écotoxicologiques et (2) les réponses de l'écosystème

Jusqu'à présent, l'étude de la génotoxicité a été principalement limitée à l'homme et aux mammifères. La corrélation directe entre ces effets génotoxiques et ceux chez d'autres organismes n'est pas recommandée dans la mesure où ils peuvent être influencés par des mécanismes différents, caractéristiques de chaque phylum, tels que des capacités différentes d'accumulation, des différences dans les voies métaboliques ou dans les effectifs enzymatiques.

Ce n'est que récemment que l'utilisation avec succès de méthodes standards pour déterminer l'altération génotoxique a permis d'établir les effets mutagènes chez les invertébrés marins (Shugart, 1988) et de montrer une corrélation directe entre les anomalies chromosomales, l'inhibition des enzymes nucléaires ainsi que les autres événements liés à la bioaccumulation de métaux lourds (Dixon, 1983) et aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) (Bolognesi *et al.*, 1991).

Les avantages dans l'utilisation de ces réponses pour surveiller les risques génotoxiques sont par eux-mêmes évidents et créent le besoin de rechercher systématiquement les polluants marins majeurs capables d'altérer l'ADN ainsi que de connaître les sources présumées d'une pollution. En fait, ces réponses se sont révélées être des outils qui ont permis de détecter de tels risques de pollution le long de zones particulières des côtes de la Méditerranée (Scarapto *et al.*, 1990; Bolognesi *et al.*, 1991).

1.2 Lésions cytoplasmiques

Les cellules eucaryotes répondent à des polluants ordinaires en présentant une série de modifications cellulaires qui peuvent en final conduire à la mort cellulaire. De telles modifications impliquent des altérations de la membrane plasmique et de l'activité de différents compartiments intracellulaires.

Un des composants subcellulaires qui s'est révélé être très sensible à la présence de contaminants extracellulaires est le système vacuolaire lysosomal. L'importance des lysosomes est liée à leur rôle normal de dégradation des macromolécules cellulaires et extracellulaires grâce aux enzymes hydrolytiques qu'ils contiennent (comme des protéases, des lipases, des nucléases, des phosphatases, etc.). L'altération des lysosomes implique souvent une perte de l'intégrité de leurs membranes, ce qui conduit à une altération de leurs fonctions et éventuellement à une libération de leurs enzymes hydrolytiques dans le cytosol. Beaucoup de contaminants de l'environnement, comme les hydrocarbures aromatiques, le tétrachlorure de carbone, les asbestos, la silice, les dérivés d'aminobenzène, le béryllium, les métaux et les virus sont séquestrés dans les lysosomes sous certaines conditions (Moore, 1985). Comme il a été décrit précédemment, une surcharge des lysosomes conduit à une déstabilisation de la membrane avec pour conséquence extrême une nécrose cellulaire liée à la libération d'enzymes lysosomales. Incontestablement, une conséquence négative de l'altération du système vacuolaire serait une digestion intracellulaire perturbée qui affecterait rapidement l'état nutritionnel de la cellule et éventuellement de l'organisme.

L'évaluation de l'altération lysosomale a aujourd'hui été largement acceptée comme un indice sensible de santé des cellules où la déstabilisation de la membrane lysosomale est liée, de façon quantitative, à l'importance de la réponse au stress. Des recherches *in vitro* (Moore, 1990) et *in vivo* (Lowe *et al.*, 1992) sur l'altération lysosomale ont été menées avec succès selon des gradients de pollution en utilisant à la fois des téléostéens et des invertébrés et ont été corrélées à la charge totale du tissu et des sédiments benthiques pour une gamme de contaminants.

1.3 Altération des voies biochimiques normales

1.3.1 Induction du système mono-oxygénase dépendant du cytochrome P450

Ce complexe multienzymatique consiste en un groupe d'hémoprotéines associées au réticulum endoplasmique lisse. Parmi le large éventail de réactions enzymatiques, ces enzymes sont capables de catalyser des réactions importantes d'un point de vue métabolique, comme l'hydroxylation oxydative de composés organiques aromatiques tels que les hydrocarbures, les réactions de O-, N- et S-désalkylation, la N-oxydation, la sulfoxydation et la désamination. En un mot, le rôle du cytochrome P450 est de convertir des substances organiques xénobiotiques, endogènes et lipophiles en composés hydrosolubles (biotransformation) afin de faciliter leur élimination de l'organisme.

Un point particulièrement intéressant pour la surveillance de la pollution est que, chez les vertébrés, l'expression des gènes codant pour le P450 et son activité enzymatique peut être induite de façon prononcée par un certain nombre de substances chimiques exogènes qui s'avèrent être des polluants courants de l'environnement, comme les HAP, les dibenzo-p-dioxines polychlorées, les dibenzofuranes, les biphenyl polyhalogénés et d'autres composés organiques halogénés comme les pesticides et les herbicides. L'induction des isoenzymes du P450 a donc suscité l'intérêt des écotoxicologistes pour son application en tant que test biologique subléthal de terrain, car il est révélateur d'une exposition aux HAP. Leur intérêt s'est aussi concentré sur la biotransformation de ces xénobiotiques qui, à l'inverse des composés endogènes normaux, a tendance à être néfaste dans la mesure où leur transformation pourrait conduire à des espèces plus réactives chimiquement (Heidelberger, 1973). Des études montrent que ces métabolites intermédiaires sont capables de se lier à l'ADN et de favoriser la mutagénèse.

L'activité du cytochrome P450 chez les vertébrés marins et dans une certaine mesure chez les invertébrés, s'est révélée être un des indicateurs les plus sensibles de la contamination de l'environnement (Payne, 1977) vu que cette estimation est fondée sur une solide connaissance des propriétés et de la régulation de ce complexe enzymatique (Stegeman, 1989). Les études de toxicité montrent que ce biomarqueur est un indicateur de stress de pollution plus sensible que d'autres variables physiologiques comme l'osmorégulation et le métabolisme énergétique (Nikunen, 1985). Ce système répond relativement vite aussi bien à une variété de polluants organiques de l'environnement qu'à des mélanges complexes comme les effluents municipaux et industriels. L'induction peut être assez rapidement détectée

et de fortes activités du P450 peuvent persister pendant plusieurs semaines après que l'exposition au contaminant ait cessé (Kloepper-Sams et Stegeman, 1989).

Il a été montré sur le terrain, que les activités du P450 chez le poisson (EROD) donnent des réponses sensibles à un gradient de pollution en HAP le long d'une vaste zone de la région nord-ouest de la Méditerranée, résultat qui a été validé par une concentration concomitante de HAP dans les sédiments (Garrigues *et al.*, 1990). Des recherches préliminaires en Méditerranée pour mesurer l'activité de la benzo (a) pyrene-mono-oxygénase (BaPMO) chez *Mytilus galloprovincialis* semblent indiquer qu'il est possible d'utiliser ces mollusques pour détecter des gradients de pollution en HAP (Selli *et al.*, 1994). Cependant des recherches supplémentaires sont nécessaires pour comprendre totalement cette réponse chez les mollusques.

1.3.2 Augmentation des niveaux cytosoliques des protéines liant les métaux

Une autre réponse biologique intervenant au niveau subcellulaire est l'induction du taux de synthèse d'une classe de protéines liant les métaux, connue sous le nom de métallothionéines (MT), suite à l'exposition aux métaux lourds. Elle est considérée comme une réponse subléthale de détoxification, mais la synthèse induite de ces protéines pourrait résulter en des coûts biologiques, ce qui réduirait la vitalité de l'individu.

De vastes études utilisant de nombreux organismes différents (Hamer, 1986) indiquent que ces protéines ont trois rôles physiologiques principaux : (1) *La détoxification des métaux lourds qui pénètrent dans les cellules à des concentrations toxiques* (Goering et Klaassen, 1984), ce qui est largement confirmé par l'inducibilité des gènes des MT par les métaux lourds accumulés à l'intérieur de la cellule (Hamer *et al.*, 1985); (2) *L'homéostasie interne du Cu et du Zn* (a) en maintenant à un niveau bas les concentrations intracellulaires de Zn et de Cu libres grâce à la liaison des métaux excédentaires sous une forme non toxique (b) en agissant comme une réserve de Cu et Zn pour une utilisation ultérieure et pour la réactivation d'apoprotéines qui nécessitent ces métaux pour être actives (Brouwer *et al.*, 1986); (3) *La participation à des fonctions métaboliques* dont le piégeage des radicaux libres (Thornalley et Vasak, 1985; Brower & Brouwer, 1998), la protection contre les altérations dues aux radiations ionisantes (Karin, 1985) et comme il a été récemment proposé, la régulation de l'expression des gènes (Roesijadi, 1998).

L'utilisation de ce biomarqueur pour la biosurveillance de l'impact des métaux sur l'environnement a été aujourd'hui validée et de nombreux exercices de biosurveillance utilisant cet indice ont été menés dans différentes régions de la Méditerranée (Viarengo *et al.*, 1988a; Pavicic *et al.*, 1991; Galdies, 1995; PNUE, 1997a; 1997b; Tambutté *et al.*, 1998).

1.4 Utilisation de réponses sub-léthales comme outils de diagnostic

1.4.1 Critères de surveillance et obtention d'échantillons

L'échantillonnage de matériel biologique pour surveiller les réponses subléthales a ses propres exigences. Il faudrait tenir compte de plusieurs facteurs biotiques et abiotiques qui peuvent influencer et donc gêner l'analyse. Le chercheur doit s'assurer que les variations dans l'amplitude des réponses sont uniquement dues à des flux temporels de pollution et non à toute autre source de variation; pour cela, les indices de stress doivent être mesurés chez la même espèce test, au même moment et au même endroit (PNUE/FAO/AIEA, 1993). Un échantillonnage incohérent ajoute un bruit de fond aux données et rend plus difficile l'identification de tendances significatives. La surveillance temporelle doit aussi prendre en compte les fluctuations de densité de la population de façon à ne pas perturber l'échantillonnage statistique. Il convient aussi tenir compte de la variation géographique qui pourrait affecter la physiologie de certaines espèces bioindicatrices.

Les valeurs de température et de pH et si possible de salinité de l'eau où les animaux sont prélevés doivent être notés. Le site doit être clairement indiqué par des coordonnées géographiques.

Une fois collectés, les échantillons doivent être manipulés de la même façon que lors des échantillonnages antérieurs et doivent être conservés de façon appropriée afin d'empêcher la dégradation de leurs entités ou activités biochimiques. Des études montrent que la plupart des paramètres biochimiques ne supportent que de courtes périodes à température ambiante et pour cette raison, l'utilisation de carboglace ou d'azote liquide sont nécessaires pour conserver les animaux ou les tissus avant de les stocker dans un congélateur à - 80°C.

Il est important de signaler que l'utilisation d'animaux mis en cage pendant de courtes périodes (semaines) et provenant de fermes aquacoles qui garantissent que les animaux ont des caractéristiques standards, au lieu d'animaux sauvages, représente un outil reconnu permettant de réduire les effets des facteurs biotiques et abiotiques sur l'état physiologique des organismes sentinelles choisis.

1.4.2 Choix des espèces

Le choix de l'organisme test doit être guidé par plusieurs critères dont son abondance et sa localisation géographique le long des côtes méditerranéennes, sa longévité (afin de permettre l'échantillonnage de plus d'une classe de plus d'un an si nécessaire), la facilité de collecte au cours de l'année et s'il peut faire l'objet de recherches en laboratoire. Il est aussi important de bien connaître la physiologie et la biochimie de l'animal. En respectant ces critères, on se rend facilement compte que

le choix possible de vertébrés et d'invertébrés marins² est très limité. En se basant sur des travaux antérieurs de recherche, plusieurs espèces ont pu être identifiées.

Les téléostéens comme les serrans (*Serranus* spp.) ont tendance à être très sensibles à la pollution due aux HAP (Narbonne *et al.*, 1991) et sont donc choisis comme organismes tests pour surveiller l'activité du cytochrome P450. Le choix de cette espèce hermaphrodite apporte certains avantages à la fois parce que les variations d'amplitude de la réponse liées au sexe peuvent être éliminées mais aussi parce que son mode de vie est sédentaire.

Le loup de mer (*Dicentrarchus labrax*) répond aussi à une contamination en HAP pour l'activité P450. Des individus sont choisis de préférence sexuellement immatures (pesant 75 ± 17 g) afin d'éliminer les différences liées au sexe dans les niveaux d'activité enzymatique. Ce poisson est élevé dans des fermes aquacoles et constitue donc une espèce idéale pour des expériences utilisant des animaux en cage dans les programmes de biosurveillance.

Le mulot rayé (*Mullus barbatus*) a également été utilisé avec succès et s'est révélé être un excellent bioindicateur pour suivre les activités P450 (Mathieu *et al.*, 1991). Il a été placé dans la catégorie des groupes de poissons à forte activité hépatique de métabolisation des xénobiotiques, montrant une activité enzymatique supérieure à celle des serrans, des loups de mer et d'autres poissons. Les mulots montrent une activité enzymatique plus élevée d'octobre à février et qui diminue juste avant la période de ponte. Selon le sexe, des différences dans l'activité P450 sont également visibles chez cette espèce, avec les mâles qui présentent une activité P450 plus élevée que les femelles durant la période de reproduction.

Mytilus galloprovincialis est le mollusque recommandé, mais s'il n'est pas disponible, *Patella* sp. peut être utilisée. L'espèce recommandée pour la mise en cage est *Mytilus galloprovincialis*. Les mollusques sont particulièrement recommandés pour évaluer la stabilité lysosomale membranaire, le contenu en métallothionéines et les altérations de l'ADN.

Les mollusques marins sessiles comme les moules sont généralement préférés pour la surveillance biologique parce qu'ils présentent les critères nécessaires qui permettent de les qualifier comme bons bioindicateurs (Viarengo et Conesi, 1991). Ils peuvent bioaccumuler plusieurs contaminants et répondent particulièrement bien aux classes principales de polluants de l'environnement. Cependant les moules n'ont pas une large distribution en Méditerranée et donc, d'autres espèces doivent être choisies là où elles sont absentes ou lorsque des données doivent être comparées dans le cadre d'une biosurveillance spatiale. Les autres inconvénients pour ceux qui souhaitent utiliser ces mollusques sont leur faible niveau à la fois d'activité MFO et de sensibilité aux xénobiotiques organiques. À titre de comparaison, le niveau de l'activité de la benzo(a)pyrène hydroxylase est

² En dehors des animaux, des recherches sont en cours pour utiliser des réponses similaires chez les plantes marines comme *Posidonia oceanica*

augmenté de seulement 50% dans des moules de régions polluées (Suteau *et al.*, 1988) alors qu'il est augmenté d'au moins trois fois pour des poissons collectés dans la même région (Addison et Edwards, 1988). Quant aux mesures de métallothionéines, les tissus de moules (tels que les branchies) se révèlent être un bon indicateur de pollution par le Cd, le Cu et le Hg mais pas par le Zn (George et Olsson, 1994).

Des espèces de *Patella* ont été récemment utilisées dans le cadre du programme de biosurveillance du MED POL, dans des régions côtières où les moules ne sont pas présentes (Israël, Malte), et ont fourni des résultats encourageants pour les biomarqueurs utilisés.

Un autre élément concernant les invertébrés est qu'en dépit de la similarité de nombreux systèmes métaboliques, il existe des différences significatives entre les divers invertébrés même au sein d'un même phylum. Par exemple la capacité à synthétiser les protéines MT en réponse au Cd n'est pas uniforme chez les mollusques et est due à des différences de bioaccumulation entre espèces (Langston *et al.*, 1989).

Les indices de stress général (comme les altérations génétiques et subcellulaires) semblent être omniprésents dans toutes les cellules eucaryotes, ce qui évite des problèmes lors du choix des espèces tests. Évidemment, il faut apporter une attention particulière à la définition du rapport signal-bruit.

1.4.3 Interprétation des résultats : quelques considérations pratiques

Une condition préalable à l'utilisation des biomarqueurs est la connaissance de leur gamme de variations physiologiques normales mais aussi de leur signification réelle. Il faut considérer toute variabilité antérieure afin d'obtenir un bon rapport signal-bruit.

Il est important de noter que de fortes variations des paramètres environnementaux peuvent influencer l'état physiologique des organismes sentinelles. Il a été observé que l'intégrité de la membrane lysosomale peut être déstabilisée par des facteurs de stress non chimiques comme l'hypoxie, l'hyperthermie, les chocs osmotiques, etc. (Moore, 1985). Il a été montré que ces facteurs modulent la réponse des enzymes du P450 aux polluants de l'environnement. Des variations de salinité, de température et de disponibilité en oxygène sont parmi les facteurs les plus significatifs qui influencent l'activité mono-oxygénase (Goksoyr et Forlin, 1992) ainsi que les niveaux de métallothionéines chez la moule (Viarengo *et al.*, 1988b) et le poisson (Engel, 1988).

Un bon exemple d'un facteur physiologique majeur qui influence l'activité de certains de ces biomarqueurs chez les vertébrés, et plus particulièrement l'activité mono-oxygénase est la variation du taux d'hormones reproductrices. Dans beaucoup d'espèces de poissons, l'activité mono-oxygénase diminue généralement juste avant ou pendant la saison de ponte. Des différences dans les activités mono-oxygénase

du foie ont également été observées selon le sexe du poisson (Stegeman *et al.*, 1986). Le stress de la reproduction peut aussi provoquer des exigences immédiates en certains précurseurs métaboliques essentiels comme les métaux essentiels tels le Cu et le Zn, ce qui en retour pourrait stimuler une mise en réserve adaptée, un transport et une libération de ces métaux au niveau de sites importants d'un point de vue métabolique. Ce processus est parfaitement en accord avec l'une des fonctions des métallothionéines (voir section 1.3.2) et justifie leur synthèse transitoire élevée lors de tels états physiologiques.

Il est donc possible de conclure qu'une utilisation en toute confiance des biomarqueurs dans la surveillance de l'environnement dépend beaucoup de la compréhension des processus régulateurs impliqués ainsi que de la caractérisation de l'amplitude des variations et de leur durée. Pour ces raisons, comme il a été mentionné ci-dessus, "le système de mise en cage" représente l'approche la plus adaptée permettant de réduire la variabilité biologique des animaux échantillonnés en différents sites le long de la côte.

1.4.4 Effets dus à des mélanges complexes de polluants

En dehors des facteurs biotiques ou abiotiques précités, les biomarqueurs peuvent également être affectés par des milliers de produits chimiques différents présents sur le terrain dans des régions contaminées; les résultats obtenus sont donc dûs aux interactions des différents polluants avec les biomarqueurs étudiés (comme des effets additifs, synergiques et/ou antagonistes). Il est très difficile de reproduire de façon réaliste de tels mélanges complexes en laboratoire; mais les lecteurs peuvent jeter un rapide coup d'œil sur les effets interactifs entre les biomarqueurs et de contaminants majeurs type en se référant au schéma ci-dessous (Fig. 1).

Les études suggèrent que la présence de xénobiotiques organiques dans l'environnement où l'échantillonnage a lieu peut réduire la synthèse des métallothionéines (Viarengo *et al.*, 1988b). Nous avons déjà vu que ces xénobiotiques organiques ont tendance à se bioaccumuler dans les lysosomes et à déstabiliser l'intégrité de la membrane lysosomale perturbant alors le taux catabolique des protéines cellulaires dont l'intégrité des biomarqueurs (Viarengo *et al.*, 1987).

De plus, des concentrations de l'ordre du nanomolaire en Cu^{2+} , Hg^{2+} et CH_3Hg^+ dans le mélange réactionnel sont capables d'inhiber de façon significative l'activité P450 (comme c'est détecté par un test catalytique) et des concentrations de l'ordre du micromolaire inhibent totalement l'enzyme (Viarengo *et al.*, 1994a). Cela a des implications importantes en ce qui concerne l'activité MFO comme outil d'évaluation de la pollution marine due à des xénobiotiques organiques et peut expliquer la faible corrélation parfois observée entre les niveaux d'activité P450 et la quantité de composés organiques xénobiotiques accumulés dans les cellules de foie de poisson.

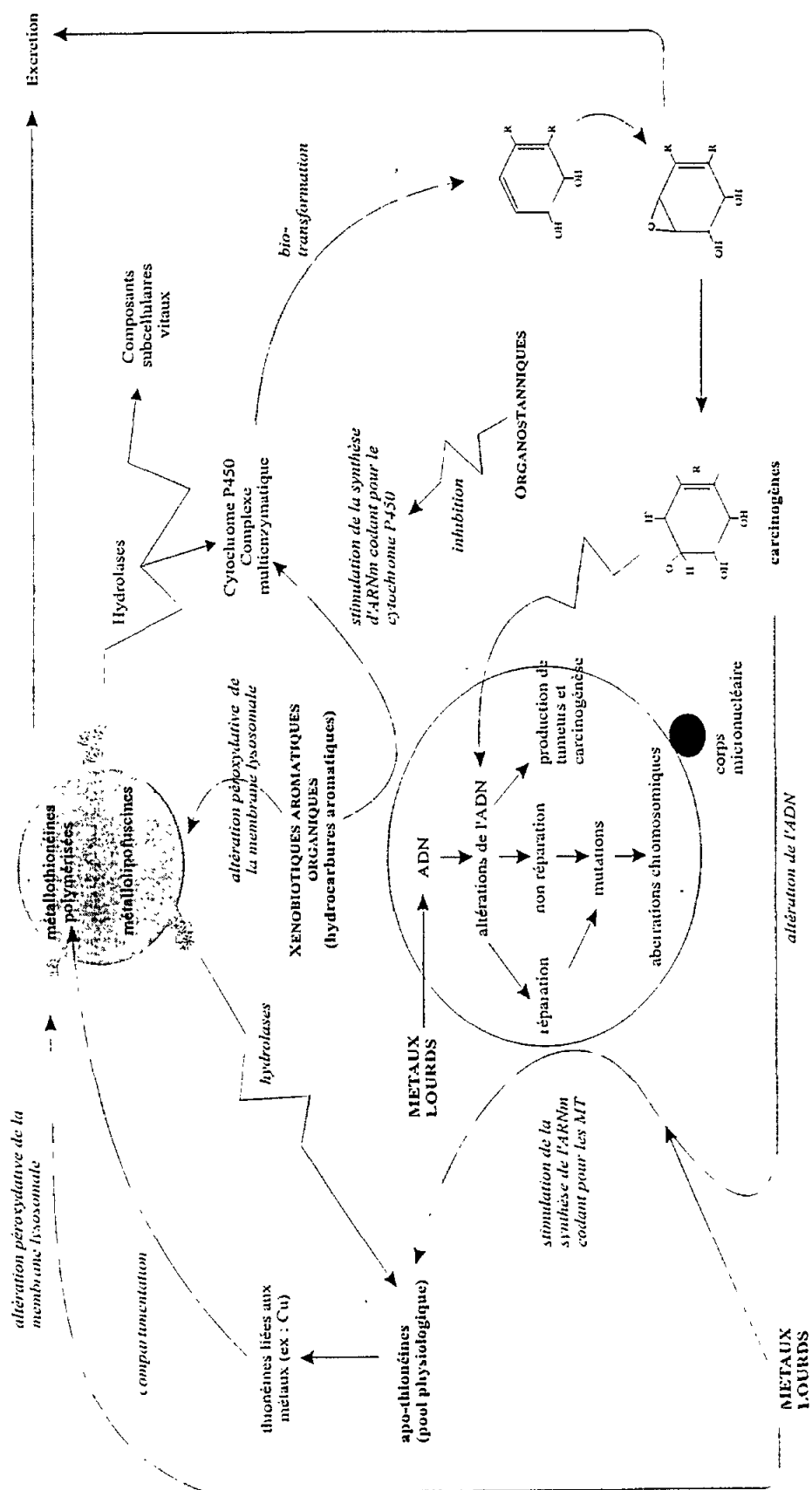


Fig. 1 Effets synergiques d'un mélange de polluants sur différentes voies métaboliques. La séquence d'événements commence lors de l'exposition de la cellule à différents types de polluants (voir le texte pour la discussion).

Une autre interférence significative est causée par la présence des composés organostanniques (TBT) bioaccumulés. La libération de ce biocide à partir de peintures anti-salissure est considérée comme un problème majeur de pollution dans des zones fermées où il y a d'importantes activités de navigation de plaisance et marchande. Des études montrent que les activités mono oxygénase peuvent être réduites en présence de niveaux même faibles de TBT, ce qui indique que les TBT ont des effets considérables sur ce complexe enzymatique (Cassar et Axiak, 1994). Ceci suggère fortement que l'exposition de poissons à ce contaminant marin très répandu pourrait altérer la réponse d'induction à d'autres contaminants de l'environnement et en particulier aux HAP.

1.5 Conclusion

Certains pourraient dire que, dans des conditions de terrain, l'implication de ces effets interactifs vis à vis de l'interprétation des indices de stress non spécifiques d'une classe particulière de contaminants, comme les variations de latence des hydrolases lysosomales et les événements mutagènes, n'est pas soumise à critique. Il en est ainsi. Cependant, des indices de stress spécifique comme le système MFO et les métallothionéines qui pourraient être sensibles à des effets interactifs, doivent être interprétés avec précaution lorsqu'ils sont appliqués à des situations de terrain où il y a des mélanges à la fois de xénobiotiques organiques et inorganiques. **Il est donc important de souligner qu'une approche correcte dans l'utilisation des biomarqueurs pour des programmes de biosurveillance consiste en l'utilisation d'une batterie de biomarqueurs : à la fois des biomarqueurs de stress comme l'altération de l'ADN ou l'évaluation de la stabilité lysosomale membranaire et des biomarqueurs d'exposition tels que les métallothionéines, l'activité EROD et éventuellement l'activité acétylcholinestérase.**

Il faut souhaiter que cette brève introduction a pu mettre en valeur à la fois la complexité d'utiliser ces réponses subléthales comme biomarqueurs de perturbation biologique et les pièges souvent rencontrés si les résultats ne sont pas interprétés correctement. L'analyse des mécanismes homéostatiques isolés n'est jamais à encourager et une vision générale doit toujours être prise en compte et transférée à l'état général de santé de l'organisme et éventuellement de la population.

2. EVALUATION DE LA STABILITE LYSOSOMALE MEMBRANAIRE

2.1 Généralités

Il est très difficile d'évaluer les changements moléculaires modifiant la perméabilité de la membrane lysosomale. Ces analyses demandent des préparations extrêmement purifiées de membrane lysosomale et leur étude à un niveau moléculaire. Une façon plus facile d'évaluer ce paramètre est d'examiner si sa fonction physiologique a été changée ou détruite suite à une exposition à des polluants.

Un outil qui lie à la fois la morphologie descriptive et la biochimie pour observer de telles modifications pathologiques est la cytochimie. Non seulement cette technique permet l'utilisation de très petits échantillons de tissus, mais en plus elle est idéale pour déceler des modifications dans des cellules et des tissus cibles particuliers.

La cytochimie a été utilisée avec succès pour estimer l'intégrité de la membrane lysosomale en visualisant les enzymes hydrolytiques à l'intérieur du lysosome et elle s'est révélée être un outil de recherche rapide et sensible pour évaluer les effets de xénobiotiques organiques et d'autres agents nocifs agissant à de faibles concentrations intracellulaires. Cette réponse généralisée intervient dans tous les types cellulaires en partant des champignons jusqu'aux vertébrés, de sorte qu'un tel test cytochimique peut être utilisé de façon relativement étendue.

2.2 Évaluation de la stabilité lysosomale membranaire : test cytochimique sur des coupes congelées

2.2.1 Principe

Le protocole suivant correspond à une procédure cytochimique permettant la détermination de la stabilité lysosomale, fondé sur l'évaluation de l'activité de la N-acétyl- β hexosaminidase, une enzyme lysosomale. La déstabilisation lysosomale est mesurée par une augmentation de la perméabilité du substrat (naphtol AS-BI N-acétyl- β -glucosaminide) et est visualisée par la réaction avec l'enzyme dans les lysosomes en présence de sels diazonium. La préparation des tissus pour l'observation des structures cellulaires nécessite l'utilisation d'une méthodologie particulière afin de produire des coupes colorées de grande qualité.

Dans cette section, toutes les observations font référence à du matériel congelé et c'est cette technique de préparation qui sera décrite.

2.2.2 Produits chimiques et solutions

Tampon de labilisation de la membrane lysosomale (Solution A)

- 0,1 M de tampon Na-citrate - 2,5% NaCl (poids : volume), pH 4,5

Milieu d'incubation du substrat (doit être préparé seulement 5 minutes avant utilisation) (Solution B)

- 20 mg de naphtol AS-BI-acétyl- β -D-glucosaminide (Sigma N4006) sont dissous dans 2,5 ml de 2-méthoxyéthanol (produit B.D.H 103624V commercialisé par Merck) et complétés à 50 ml avec la solution A, contenant également 3,5 g de POLYPEP (Sigma P5115; polypeptide de faible viscosité agissant en tant que stabilisateur des coupes).

Colorant diazonium (Solution C)

- 0,1 M de tampon Na-phosphate, pH 7,4 contenant 1 mg/ml de colorant diazonium Fast Violet B (Sigma, F1631), (Note : solution saturée)

D'autres colorants peuvent être utilisés comme :

- Fast Garnet GBC (Sigma)
- Fast Red Violet LB (Difco)
- Fast Blue BB (Sigma)
- Fast Blue RR (Sigma)

Fixateur (Solution D)

- calcium-formol : 2% de Ca-acétate (poids : volume) + 10 % de formaldéhyde (volume : volume)
Milieu de montage : milieu de montage aqueux (Laboratoires Vector H1000)
ou glycérol gélatiné Kaiser
- Azote liquide

2.2.3 Préparation du tissu

Couper rapidement 5 petits morceaux (3-4 mm³) d'organe/tissu (habituellement la glande digestive de mollusque ou le foie de poisson) obtenu à partir de 5 animaux différents et les placer rapidement sur une platine porte-objet de cryostat en aluminium (alignés sur une ligne droite en travers du centre).

Pendant la dissection, laisser la platine porte-objet sur de la glace et la mettre ensuite 40 secondes dans une petite boîte en plastique contenant du N-hexane³ pré-refroidi à -70°C grâce à de l'azote liquide. Envelopper la platine porte-objet de 4 à 5 morceaux de Parafilm et conserver immédiatement à -80°C. (À cette température les préparations de tissu gardent leur intégrité pendant des mois).

A l'aide d'un cryostat de Bright ou d'un autre matériel équivalent (température dans l'enceinte inférieure à -25°C), réaliser des coupes de 10 µm d'épaisseur en utilisant un couteau avec un angle de 15°. Transférer les coupes sur des lames "chaudes" (à température ambiante) pour les sécher rapidement. Les coupes peuvent être conservées dans le cryostat (pendant au moins 4 heures).

2.2.4 Détermination enzymatique de la stabilité membranaire

Placer les coupes dans un bac d'Hellendal contenant la solution A pendant différentes durées (0, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40 minutes) à 37°C afin de déterminer la

³ Le fait de refroidir dans l'hexane empêche la formation de glace dans le tissu et donc diminue toute altération structurale des composants subcellulaires

gamme de temps du pré-traitement nécessaire pour totalement labiliser la membrane lysosomale (c.-à-d la période de labilisation). Dans les 5 dernières minutes utiliser un bain à agitation.

Transférer l'ensemble des lames dans la solution B et incuber les lames pendant 20 minutes à 37 °C dans un bac d'Hellendal de préférence dans un bain à agitation.

Laver les lames dans de l'eau de mer filtrée à température ambiante ou avec une solution saline (NaCl 3%) à 37°C pendant 2 à 3 minutes. Transférer les lames dans la solution C contenant le coupleur diazonium pendant 10 minutes à température ambiante. Rincer rapidement les lames à l'eau courante pendant 5 minutes. Fixer les coupes pendant 10 minutes dans la solution D à 4°C (ou les monter directement dans le glycérol gélatiné), rincer à l'eau distillée et monter dans un milieu de montage aqueux.

2.2.5 Interprétation des résultats

Observer les lames au microscope et diviser chaque coupe en quatre zones (quartiers) pour l'interprétation statistique (voir Fig. 2).

Les lysosomes se coloreront en rougeâtre-violet en raison de la réactivité du substrat avec la N-acétyl-β-hexosaminidase. La période moyenne de labilisation (LP) pour chaque coupe correspond au temps moyen d'incubation dans le tampon acide qui produit la réactivité maximale de coloration. Les périodes moyennes de labilisation pour les autres échantillons (dans le cas présent n=5) sont obtenues de la même façon.

Analyser un quartier de chaque ensemble de coupes de tissu appartenant au même animal et déterminer le quartier de la coupe présentant la plus forte coloration (celui à partir duquel la période moyenne de labilisation a été déduite). Répéter l'analyse pour les trois quartiers restants du premier animal analysé. La moyenne des résultats obtenus représente la valeur de LP de l'échantillon 1. La même procédure est suivie pour les autres coupes présentes sur les lames provenant des quatre animaux restant. Une valeur moyenne est ensuite obtenue pour chaque section correspondant à un seul animal et successivement pour les autres sections présentes sur la lame et correspondant aux 4 autres animaux. A la fin, une valeur moyenne de la stabilité de la membrane lysosomale de l'échantillon sera calculée en utilisant les 5 données obtenues à partir des 5 animaux analysés.

Comparer les échantillons tests à ceux pris dans un site de référence et déterminer le gradient de cytotoxicité. Une réduction de la période moyenne de labilisation selon un gradient attendu de pollution indiquerait un stress cellulaire dû à la pollution.

Toute diminution dans l'intensité de coloration dans des coupes successives suivant celle présentant la coloration maximale peut être due à une perte d'enzyme

par diffusion à partir des lysosomes totalement libérés. Si il y a 2 pics d'intensité de coloration, il faut alors uniquement considérer le pic principal comme étant celui de la LP. Ceci peut être du à des propriétés de latence différentes des hydrolases lysosomales concernées.

Le temps "0" est utilisé uniquement pour vérifier si l'activité lysosomale est correcte et ne doit pas être pris en considération dans l'évaluation du pic principal de coloration.

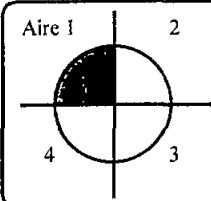
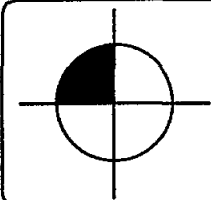
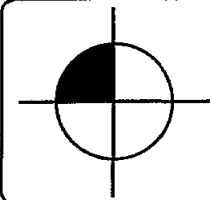
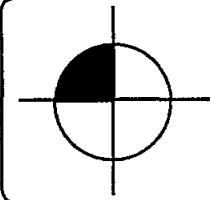
Lames	Sections en série de tissu	Durée d'immersion dans la solution A	Animal			
			1	2	3	etc.
1		2 min				
2		5 min				
3		10 min	X			
4		30 min				
etc	Spécimen n°1 Spécimen n°2 etc...					

Fig. 2 Intensité de coloration

Zone 1 (10 min) > Zone 1 (30 min) > Zone 1 (15 min) ...etc.

Zone 2 (10 min) > Zone 2 (30 min) > Zone 2 (20 min) ...etc.

Zone 3 (15 min) > Zone 3 (20 min) > Zone 3 (30 min) ...etc.

Zone 4 (15 min) > Zone 4 (30 min) > Zone 4 (20 min) ...etc.

Valeur de LP pour l'animal 1 = moyenne des 4 zones = 12,5 minutes

Des intervalles de 3 à 5 minutes sont généralement satisfaisants pour la plupart des situations. Les données peuvent ensuite être traitées de façon statistique par le test U de Mann et Whitney (Speigel, 1961) et comparées à des valeurs de référence. Pour la glande digestive de moules, des intervalles de temps de 3, 5, 10, 15, 20, 30 et 40 minutes sont généralement utilisés.

2.3 Détermination de la stabilité lysosomale membranaire dans des cellules vivantes : test de rétention du rouge neutre

Le rouge neutre est un colorant lipophile et en tant que tel, il traverse librement la membrane cellulaire. À l'intérieur des cellules, le composé est piégé par protonisation dans les lysosomes et est accumulé dans ces organelles où il peut être visualisé par la microscopie. Le degré d'emprisonnement de ce marqueur lysosomotrope dépend du pH du lysosome autant que de l'efficacité de la pompe à protons associée à la membrane (Segien, 1983).

L'environnement acide des lysosomes est maintenu par une pompe à protons dépendante d'une Mg^{2+} -ATPase (Ohkuma *et al*, 1982), le test de rétention du rouge neutre reflète le flux de sortie du contenu lysosomal vers le cytosol suite à l'altération de la membrane et, probablement, à l'altération de la pompe à protons (Lowe *et al.*, 1992). Donc toute altération de ce dernier système résultera en une diminution du temps de rétention de la sonde. Les études montrent que, de façon similaire à la méthode cytochimique décrite ci-dessus, le test de rétention du rouge est sensible aux classes majeures de polluants chimiques (Lohse, 1990). Le protocole suivant a été spécialement adapté pour être utilisé sur les moules.

2.3.1 Produits chimiques et solutions

- Solution saline physiologique

Hepes 20 mM (4,77g)
NaCl 436 mM (25,48g)
MgSO₄ 53 mM (13,06g)
KCl 10 mM (0,75g)
CaCl₂ 10 mM (1,47g)

Dissoudre dans 1 litre d'eau distillée. Gazer pendant 10 minutes (95% O₂ : 5% CO₂) et ajuster le pH à 7,3 avec du NaOH 1M. Conserver la solution au réfrigérateur mais l'utiliser à température ambiante.

- Solution de rouge neutre

Préparer une solution mère en dissolvant 20 mg de poudre de rouge neutre dans 1ml de diméthyle sulfoxyde (DMSO). Transférer 5µl de la solution mère dans 995µl de solution physiologique (solution de travail). Conserver le rouge neutre à l'obscurité et au réfrigérateur lorsqu'il n'est pas utilisé. La solution de travail doit être préparée extemporanément.

2.3.2 Évaluation pratique

Le protocole suivant est d'après Lowe *et al.* (1992) et Lowe *et al.* (1995).

Remplir des tubes Eppendorf avec du sigmacote (SIGMA), attendre 10 à 30 min puis remettre le sigmacote dans son flacon (il est réutilisable). Mettre 2µl de Poly-L-Lysine (SIGMA), diluée au 1/10 dans de l'eau distillée, sur une lame de microscopie et l'étaler avec une lamelle. Laisser sécher dans une chambre humide.

Insérer les ciseaux à mi-chemin le long de la surface ventrale de la moule et écarter partiellement les valves pour pouvoir insérer la seringue hypodermique. Enlever l'eau de la coquille. Remplir une seringue hypodermique avec 0,5 ml de solution saline physiologique et aspirer 0,5 ml d'hémolymph du muscle abducteur postérieur de la moule. Après avoir obtenu un échantillon d'hémolymph, éliminer l'aiguille et vider le contenu de la seringue dans un tube Eppendorf siliconé.

Distribuer 40µl de mélange de solution saline-hémolymph sur la lame, là où la poly-L-lysine a été étalée et incuber dans la chambre humide pendant 30 minutes pour permettre aux cellules de se coller. Enlever avec précaution l'excès de solution de la lame en la plaçant sur le côté et en laissant le liquide s'écouler. Ajouter 40µl de la solution de travail de rouge neutre et laisser dans la chambre humide pendant 15 minutes (maintenue à 15-16°C pendant l'analyse). Mettre une lamelle et observer la préparation au microscope.

Observer les lamelles toutes les 15 minutes pendant la première heure puis toutes les 30 minutes pendant les 2 heures suivantes. Déterminer le temps au bout duquel 50% des lysosomes dans les cellules ont libéré le rouge neutre dans le cytosol. Déterminer une valeur moyenne pour chaque animal et ensuite une valeur moyenne pour tous les animaux appartenant au même lot. Comparer les échantillons provenant de sites qui font l'objet de la surveillance à ceux pris dans des sites de référence et déterminer le gradient de cytotoxicité. Une augmentation des taux de libération indiquerait un stress cellulaire dû à la pollution.

Résultats :

Echantillons	0	15	30	45	60	90
Contrôle	+	+	+	+	+	+
Traité	+	+	±	-	-	-

Légende :

+ : plus de 50% des lysosomes dans les cellules retiennent le rouge neutre

- : moins de 50% des lysosomes dans les cellules retiennent le rouge neutre

3. ÉVALUATION DES EFFETS GÉNOTOXIQUES

3.1 Méthode d'élution alcaline sur filtre

Le protocole suivant, communément connu sous le nom de méthode d'élution alcaline sur filtre (AEF) est une méthode largement utilisée pour déterminer l'étendue de l'altération génétique chez une grande variété d'organismes marins (Erickson *et al.*, 1980). Des cassures dans le simple brin d'ADN ou des points de faiblesse dans les alcali sont identifiés en mesurant le taux auquel l'ADN simple brin passe à travers une membrane filtrante de porosité connue dans des conditions alcalines de dénaturation.

La sensibilité de la méthode dépend de la complexité de l'ADN qui varie considérablement selon les différents taxa. Ainsi, l'ADN d'un taxon inférieur éluera plus rapidement que celui d'un taxon supérieur même si il est en parfait état. Un avantage intéressant dans l'utilisation de cette méthode est qu'elle permet de déterminer l'altération génotoxique chez des animaux vivants, et dans beaucoup de cas, de petites biopsies de tissu peuvent suffire. De plus, la détermination microfluorimétrique de l'ADN (Cesarone *et al.*, 1979) augmente la sensibilité et la reproductibilité de la méthode d'élution alcaline.

3.1.1 Équipement

- pompes péristaltiques à canaux multiples (débit 1 à 10 ml/ h);
- spectrofluorimètre : excitation : 360 nm / émission : 450 nm;
- collecteur de fractions;
- pH-mètre capable de mesurer un pH supérieur à 12;
- filtres (Millipore), Type GV 0,22 µm, GVWP 02500⁴;
- microscope inversé;
- centrifugeuse;
- support de filtre pour micro-seringue, embout Luer (XX30 02500)⁴
- cylindre en acier inoxydable pour micro-seringue (10 ml de capacité)⁴
- grille support en acier inoxydable pour micro-seringue⁴
- joint torique en téflon⁴
- joint d'étanchéité plat en téflon⁴

3.1.2 Produits chimiques et solutions

- Tampon d'homogénéisation

NaCl 0,14 M

KH₂PO₄ 1,47 mM

KCl 2,7 mM

Na₂HPO₄ 8,1 mM

⁴ Millipore Corp. USA.

EDTA 0,1 M

Porter la solution à pH 7,4 avec du NaOH

- Solution équilibrée de sels de HANKS 2X

NaCl 273,8 mM

KCl 10,73 mM

MgSO₄, 7H₂O 0,81 mM

CaCl₂, 2H₂O 2,52 mM

Na₂HPO₄, 2H₂O 0,674 mM

KH₂PO₄ 0,88 mM

NaHCO₃ 8,33 mM

D-Glucose, H₂O 10,09 mM

- Solution de lyse

NaCl 2 M

EDTA 0,02 M

N-laurylsarcosinate, sel de sodium (SIGMA L5125) 0,2%

Porter la solution à pH 10,2 avec du NaOH 1N.

- Solution de rinçage

EDTA 0,02 M, pH 10,2

Porter la solution à pH 10,2 avec du NaOH 1N

- Solution d'élution

EDTA 0,04 M. Porter à pH 12,3 avec du tétraéthylammonium hydroxyde (Merck 822149.0250)

- Solution BIS de travail

Préparer la solution BIS $1,5 \cdot 10^{-4}$ M en dissolvant 8 mg de bisbenzimidazole (33258 Hoescht : 2-[2-4-hydroxy-phényl]-6-benzimidazole]-6-(1-méthyl-4-pipérazyl)-benzimidazole trihydrochloride (Farbwerke Hoescht, Francfort, Allemagne), PM : 533,9) dans 100 ml d'eau distillée. Faire des aliquotes de 1 ml dans des tubes Eppendorf et conserver à -20°C. Cette solution reste stable pendant au moins une semaine lorsqu'elle est conservée à 4°C dans des bouteilles sombres en verre et enveloppées dans du papier d'aluminium. Préparer la solution de travail en ajoutant 100 ml d'eau contenant 0,154 M de NaCl et 0,015 M de Na₃citrate (tampon SSC, pH 7,0) à 2 ml de la solution mère de BIS. La solution finale est la solution BIS de travail.

- Standard d'ADN

L'ADN de thymus de veau provient de la SIGMA Chemical Compagny (St. Louis, Mo). Il est dissous dans du SSC stérile, pH 7,0, passé aux ultrasons pendant 10 secondes afin d'augmenter sa solubilité et dilué à une concentration de 1mg/ml. Cette solution mère a été diluée avec du SSC, pH 7,0.

3.1.3 Préparation des échantillons à partir des tissus d'organismes aquatiques

Eviter d'altérer l'ADN lors des manipulations en utilisant de fortes concentrations d'EDTA (0,03-0,1 M). Garder toujours le matériel sur de la glace et essayer de travailler rapidement.

3.1.3.1 Foie de poisson

Couper le foie et le rincer dans le tampon d'homogénéisation pour éliminer les résidus de sang. Passer immédiatement au stade suivant ou conserver à -80°C. Homogénéiser le foie dans le tampon dans la proportion 1:5 poids/volume.

3.1.3.2 Cellules de branchie de moule

Ouvrir les moules et enlever les cellules branchiales. Isoler les cellules branchiales par digestion enzymatique avec une solution de dispase (Boehringer, Mannheim), 0,1 mg/ml dans la solution modifiée équilibrée de sels de Hanks (2X), pendant 10 min à 37°C. La suspension cellulaire obtenue par filtration est centrifugée à 1000 rpm pendant 10 min.

3.1.3.3 Hémolymphe de moule

Introduire une seringue hypodermique dans le muscle grand adducteur et aspirer un peu d'hémolymphe. Diluer l'échantillon avec un volume égal de solution 2X de Hanks.

3.1.4 Mise en place de l'échantillon

Préparer l'appareil d'élution. Mettre un filtre (de porosité 0,22 µm) sur un support en acier inoxydable placé sur un support de filtre, mettre ensuite un joint torique d'étanchéité en téflon, et visser un cylindre d'extension en acier inoxydable.

Déposer l'échantillon sur le filtre (10 à 20 mg de foie de poisson par filtre; 1 à 2 10⁶ hémocytes ou cellules branchiales par filtre). Déterminer le nombre de cellules en utilisant une chambre de comptage.

3.1.5 Lyse des cellules

Rincer les filtres avec 4,5 ml de solution de lyse. Répéter cette opération en utilisant 2,5 ml de solution de rinçage au même débit.

3.1.6 Élution du simple brin d'ADN

L'élution doit être réalisée sous des conditions de lumière réduites.

Éluer l'ADN à travers des filtres Durapore (de 25 mm de diamètre et 0,2 μ m de porosité) placés sur des supports de filtres (Millipore Corp. USA) avec 10 ml de solution d'élution à un débit de 0,05 ml/min (i. e. 2 ml par fraction). Collecter ce volume dans 5 tubes, chacun contenant 2 ml.

Récupérer l'ADN restant en enlevant le filtre et en l'immergeant dans 4 ml de solution d'élution. Le couper en petits morceaux. Agiter vigoureusement.

Rincer le support de filtre et les tubes avec 4 ml de solution d'élution. Ceci correspond au "volume mort".

3.1.7 Détermination microfluorimétrique de l'ADN

Dans des tubes en verre jetables, placer des aliquotes de 1 ml de chaque fraction d'élution, 1 ml d'ADN retenu sur le filtre et 1 ml de milieu de rinçage du support de filtre. Neutraliser chaque tube avec 0,4 ml de KH_2PO_4 0,2 M et ajouter 0,6 ml d'eau afin d'obtenir un volume de 2 ml. Ajouter enfin 1 ml de solution BIS de travail et homogénéiser au vortex. Déterminer l'augmentation de fluorescence due à la liaison du fluorochrome à l'ADN, en utilisant un spectrofluorimètre avec une longueur d'onde d'excitation fixée à 360 nm et une longueur d'onde d'émission fixée à 450 nm.

3.1.8 Calculs

3.1.8.1 Calcul de la pente des courbes d'élution (taux d'élution)

Les pentes d'élution sont calculées à partir des représentations semi-logarithmique de la fraction d'ADN retenue sur le filtre en fonction du volume élué ou du temps d'élution et sont exprimées comme le taux moyen d'élution. La pente de la courbe d'élution est une mesure du nombre de cassures en unités arbitraires. Dans la mesure où le taux d'élution est plus rapide pour de l'ADN cassé que pour de l'ADN intact, la quantité d'ADN retenu sur le filtre est une mesure des cassures de l'ADN simple brin. Le taux d'élution diminue de façon exponentielle en fonction du temps d'élution ou du volume (nombre de fractions).

Lorsque le profil d'élution se rapproche d'une ligne droite, il est possible d'utiliser une équation cinétique de premier ordre.

Pour une cinétique de premier ordre d'élution alcaline :

$$y = ae^{-kv}$$

où

y = fraction d'ADN retenu sur le filtre après élution du volume v

a = quantité d'ADN présent sur le filtre au volume 0 de solution

v = volume

$$\ln y = -kv + \ln a$$

et

$$K = -\ln y/v$$

Le taux d'élution (K) peut aussi être exprimé en fonction de t (temps d'élution).

3.1.8.2 Calcul du Facteur de Scission du Brin (SSF)

Une valeur caractérisant le nombre relatif de points de rupture du brin, désignée sous le nom de "facteur de scission du brin", a été calculée en prenant la valeur absolue du $\log_{10}$ du pourcentage d'ADN retenu dans l'échantillon traité élué par un volume connu d'élution, divisé par le pourcentage d'ADN retenu dans l'échantillon témoin élué par le même volume. Donc un facteur de scission 0 du brin d'ADN indique qu'il n'y a pas de rupture du brin. Des valeurs supérieures à 0 indiquent une valeur relative des ruptures d'ADN dans les cellules exposées (Meyn et Jenkins, 1983).

$$SSF = \log \frac{\% \text{ d'ADN élué dans 6 ml d'échantillon test}}{\% \text{ d'ADN élué dans 6 ml d'échantillon témoin}}$$

Tableau 1

Tableaux présentant des valeurs arbitraires

Échantillon témoin

AND Standard: 1 µg			Fluorescence			
			160			
Numéro de fraction	Volume (ml)	Valeur X Volume total (ml)		Fluorescence totale	Y (% retenu)	En Y
1	1,8	1,8	45	81	98,4	4,58
2	1,9	3,7	45	85	96,7	4,57

3	1,8	5,5	42	76	95,2	4,55
4	1,8	7,3	39	70,2	93,8	4,54
5	2,1	9,4	40	82	92,3	4,52
Mort	4		38	152		
Filtre	4		1138	4552		
		Fluorescence totale		5098		
		AND total (µg)		31,8		

Échantillon traité ou exposé

AND Standard: 1 µg			Fluorescence			
			160			
Numéro de fraction	Volume (ml)	Valeur X Volume total (ml)		Fluorescence totale	Y (% retenu)	En Y
1	2,0	2,0	248	496	87,8	4,48
2	2,0	4,0	205	410	77,8	4,35
3	2,0	6,0	142	284	70,8	4,26
4	2,0	8,0	98	196	66,0	4,19
5	2,0	10,0	92	184	61,5	4,12
Mort	4		65	260		
Filtre	4		562	2248		
		Fluorescence totale		4078		
		AND total (µg)		25,4		

Exemple :

Échantillon témoin	Échantillons traités ou pollués
K = 0,0088	K = 0,0575
Y = 70,8	Y = 95,2

$$SSF = \log (70,8/95,2) = -0,129 \text{ pour un volume d'élution de 6 ml}$$

3.2 Détermination de la fréquence des micronoyaux

3.2.1 Généralités

Les micronoyaux sont de petits corps contenant de l'ADN qui peuvent être présents près du noyau de la cellule à l'interphase, résultant à la fois d'une cassure des chromosomes et d'un mauvais fonctionnement du fuseau.

Le type de mutations qui pourraient contribuer à la production de micronoyaux inclut :

- a) des mutations des protéines du kinétochore, des centromères et de l'appareil du fuseau qui peuvent conduire à une distribution inégale des chromosomes ou à une perte du chromosome entier à l'anaphase,
- b) des ruptures non réparées du brin d'ADN induites par des agents génotoxiques de l'environnement et endogènes, ce qui pourrait produire des fragments de chromosomes acentriques.

Les études montrent que l'apparition de micronoyaux peut fournir une information sur l'altération génétique accumulée au cours de l'évolution de la vie des cellules même lors de courtes phases de contamination. Ces considérations montrent l'aptitude de ce test à suivre, de façon intégrée dans le temps, l'étendue de l'altération génétique chez les organismes marins. Le protocole suivant a été établi afin d'estimer la fréquence des micronoyaux dans les cellules.

3.2.2 Équipement

- centrifugeuse
- microscope optique

3.2.3 Produits chimiques et solutions

- Solution équilibrée de sels de HANKS 2X (HBSS 2X)

NaCl 273,8 mM

KCl 10,73 mM

MgSO₄, 7H₂O 0,81 mM

CaCl₂, 2H₂O 2,52 mM

Na₂HPO₄, 2H₂O 0,674 mM

KH₂PO₄ 0,88 mM

NaHCO₃ 8,33 mM

D-Glucose, H₂O 10,09 mM

- Solution de Dispase

Dispase I (protéase neutre; classe I, Boehringer Mannheim, Allemagne)
0,1 mg/ml dans l'HBSS 2X.

- Méthanol : acide acétique (3 : 1)
- Giemsa 3%

3.2.4 Méthode

3.2.4.1 Préparation de la suspension cellulaire

Hémolymph de moules

Les échantillons d'hémolymph sont prélevés dans le sinus du muscle adducteur postérieur à l'aide d'une seringue hypodermique. Les échantillons sont dilués avec un volume égal de solution équilibrée de sels de Hanks et centrifugés à 1000 rpm.

Branchies de moules

Les branchies sont prélevées et les cellules sont isolées par digestion enzymatique avec une solution de Dispase (Boehringer Mannheim, Allemagne), 0,1 mg/ml dans la solution modifiée (20⁰/₀₀) équilibrée de sels de Hanks pendant 10 min à 37°C. La suspension cellulaire obtenue par filtration est centrifugée à 1 000 rpm pendant 10 min.

3.2.4.2 Préparation des lames

Les aliquotes de culot cellulaire de branchies de moule et/ou d'hémolymph sont fixés dans le méthanol : acide acétique (3 : 1) pendant 20 min, étalés sur des lames, séchés et colorés avec du Giemsa 3%. Les lames sont codées et comptées.

3.2.4.3 Comptage des lames

Par animal, deux mille cellules avec un cytoplasme en bon état sont comptées sous immersion à huile à un grossissement de 1000 x. En raison de la grande variabilité interindividuelle de la fréquence des micronoyaux, 8 à 10 animaux doivent être analysés pour chaque point expérimental.

Les critères suivants doivent être réunis lors du comptage :

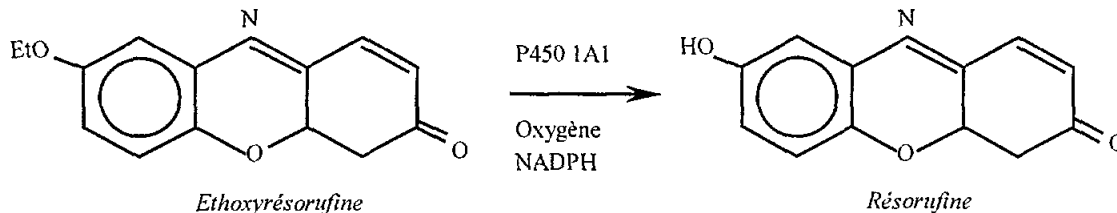
- seules les cellules intactes doivent être considérées,
- la structure de la chromatine et l'intensité de couleur doivent être équivalentes à celle du noyau principal,

- les micronoyaux doivent être sur le même plan optique que le noyau principal,
- les micronoyaux doivent être ronds ou ovales,
- les micronoyaux ne doivent pas être fragmentés (afin d'exclure les petites particules colorées et les cellules apoptotiques),
- les micronoyaux doivent être situés à moins de 4 fois du plus court axe du noyau le plus proche.

4. ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ DES OXYDASES À FONCTION MIXTE

4.1 Généralités et principe

Cette section comprend le protocole complet pour déterminer l'activité du complexe multienzymatique du cytochrome P450 chez le poisson en tant que biomarqueur de réponse biologique à des xénobiotiques organiques de l'environnement marin. Cette section décrit les méthodes de préparation des fractions subcellulaires contenant les MFO, de détermination de l'activité catalytique de l'éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD) et d'évaluation du contenu en protéines. La détermination de l'activité catalytique est fondée sur l'incubation d'un substrat (éthoxyrésorufine) avec une préparation enzymatique et un cofacteur (NADPH) dans un tampon adapté. L'augmentation de fluorescence due à la production de résorufine est alors évaluée à l'aide d'un spectrofluorimètre.



Ce protocole a été testé à la fois sur le terrain et en laboratoire comme biomarqueur d'exposition, principalement aux HAP, PCB et chlorodibenzodioxines. Il peut également être appliqué aux pentoxy ou benzyloxy-résorufine-O-de-alkylases (PROD et BROD) pour indiquer l'induction d'autres isozymes P450 (Burke et Meyer, 1983).

4.1.1 Échantillonnage

Un problème de grande importance dans l'échantillonnage de poissons sur le terrain est la collecte et la conservation des échantillons jusqu'à ce qu'ils soient traités dans le laboratoire. L'hémoprotéine se dégrade rapidement dans le tissu intact ou dans les fractions subcellulaires; même l'utilisation d'azote liquide pour la conservation peut perturber l'activité enzymatique (Forlin et Andersson, 1985). Les échantillons qui ont été décongelés ou conservés à -20°C ne sont pas utilisables pour les mesures catalytiques.

Lignes directrices pour la collecte des poissons⁵ :

- les poissons doivent être échantillonnés en dehors de la saison de ponte qui dépend de l'espèce et l'indice gonadosomatique doit être noté;
- les poissons doivent être échantillonnés dans une gamme définie de longueur qui dépend de l'espèce;
- les individus mâles (présentant généralement une activité EROD plus élevée que les femelles) ou les individus femelles (présentant un taux d'induction plus élevé selon que les sites sont fortement ou peu pollués) peuvent être utilisés à condition que les données ne soient pas mélangées;
- le nombre d'individus échantillonnés doit être représentatif pour chaque site afin de permettre un traitement statistique adapté (5 à 10 par site);
- seuls les poissons sans maladie interne ou externe visibles doivent être utilisés pour un traitement ultérieur, et
- la température de l'eau doit être mesurée au moment, au lieu et à la profondeur de capture.

4.1.2 Équipement

- balance de précision à 0,1 g,
- instruments classiques de dissection,
- baquet de glace,
- série de petits béciers,
- perceuse électrique capable de tourner à 2700 rpm,
- homogénéisateur Potter-Elvehjem en verre-téflon (5 ou 15 ml),
- éprouvette graduée (de 10 ou 25 ml de contenance),
- ultracentrifugeuse réfrigérée,
- tubes gradués : 5-15ml,
- pipettes Pasteur,
- cryotubes Nalgène,
- micropipettes à embouts jetables délivrant 10, 25, 50, 100, 200, 1000 µl,
- pipette en verre délivrant 2ml,
- fluorimètre.

⁵ Rapport du "Workshop on Biological Effects Monitoring Techniques", Aberdeen, Scotland, 2-6 Octobre 1995"

4.1.3 Produits chimiques et solutions⁶

- Solution A
KCl 150mM
- Solution B
Hepes 10mM contenant du saccharose 250mM, du Na₂ EDTA 1mM. Ajuster à pH 7,4 avec du KOH (34 - 36%, Prolabo).
- Solution C
80% de solution B + 20% de glycérol (volume/volume)
- Solution D
18,2% de KH₂ PO₄ (Prolabo) 50mM + 22,2% de Na₂ HPO₄ (Prolabo) 200 mM. Ajuster à 100% avec de l'eau, pH 7,44
- Conservation des solutions et des produits chimiques
+4°C pour les solutions A, B, C, D, G-6PDH
-20°C pour NADP, G-6-P, Résorufine
-80°C pour l'éthoxyrésorufine (de préférence).

4.1.4 Préparation des échantillons pour l'analyse

Cette section décrit les étapes de préparation de la fraction S9 et des échantillons de microsomes avant la mesure de l'activité des MFOs. Il est toujours pratique de préparer à l'avance le plus de réactifs et de solutions possibles. La plupart, comme ceux nécessaires à la détermination des protéines, sont stables et supportent la congélation et la décongélation si ils sont gardés dans des bouteilles en plastique. Il n'est en général pas possible de préparer les solutions du nucléotide coenzyme à l'avance, cependant, et dans la mesure où (habituellement) de petites quantités sont nécessaires et qu'elles sont relativement chères, il est souhaitable de peser au préalable les quantités appropriées et de les garder (au froid et à l'abri de l'humidité) dans de petits flacons.

Les fractions S9 sont préparées par centrifugation (9 000 x g pendant 15 minutes). Les fractions microsomales sont généralement préparées par ultracentrifugation (100 000 x g pendant 90 minutes) d'homogénats de tissus frais ou congelés (comme le foie ou l'hépatopancréas). Les mesures de l'activité du cytochrome P450 peuvent être réalisées à la fois sur le surnageant S9 et sur la fraction microsomale 100 000 x g remise en suspension.

⁶ Tous les produits chimiques proviennent de chez SIGMA

4.1.4.1 Dissection du tissu et préparation pour l'analyse

Sacrifier le poisson en sectionnant le cordon médullaire au niveau des nageoires pectorales et en insérant la lame des ciseaux dans le cerveau. Peser le poisson avec une précision de $\pm 1\%$.

Disséquer le foie en évitant de rompre la vésicule biliaire dans la mesure où la bile peut contenir des inhibiteurs de MFO. Peser le foie (précision $\pm 1\%$) et le mettre dans un bécher sur de la glace.

Toutes les opérations suivantes doivent être réalisées à 4°C.

4.1.4.2 Homogénéisation du tissu

Couper le foie pesé (de façon idéale $\geq 1\text{g}$, pesé à 0,1g près) avec des ciseaux, le rincer dans la solution A et le sécher sur du papier absorbant.

Ajuster la solution B avec du PMSF 0,1 M (dissous dans de l'éthanol).

Mettre le foie dans un tube homogénéisateur Potter en verre sur de la glace et ajouter la solution B dans un rapport 1:5, poids : volume. Homogénéiser par 10 allers-retours verticaux à grande vitesse, en maintenant le tube refroidi dans la glace. Ceci donne "l'homogénat brut".

4.1.4.3 Préparation de la fraction S9 et du culot 100 000 x g (microsomes)

Placer l'homogénat dans des tubes à centrifugation et centrifuger pendant 15 minutes à 9 000 x g. Récupérer le surnageant (S9), sans la phase lipidique, le subdiviser en petits aliquotes (100-200 μl) à conserver à -80°C . Utiliser un aliquote de S9 pour la détermination des protéines selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

Une alternative est de préparer la fraction 100 000 x g (microsomes). Dans ce cas, transférer la fraction S9 dans un tube à ultracentrifugation et centrifuger à 100 000 x g pendant 50 min à 4°C. Éliminer le surnageant (cytosol) et remettre en suspension le culot de microsomes dans 1 ml de solution C.

Transférer cette suspension dans le Potter, homogénéiser avec 5 allers-retours à la main en utilisant un embout en téflon et en gardant l'homogénéisateur dans la glace. Transférer la suspension homogénéisée dans un tube gradué et noter son volume. Conserver sur la glace.

Ceci constitue la préparation microsomale prête pour la quantification de la concentration en protéines et des activités enzymatiques.

Congeler des aliquotes (100 et 200µl) dans des cryotubes Nalgène de 1,5 ml et conserver à -80°C ou dans de la carboglace si besoin est, pour servir de référence future.

4.1.5 Détermination de la concentration en protéines

Méthode d'après Bradford (1976).

Des cuvettes de spectrophotomètre de 1,5 ml en polystyrène sont préparées. Elles contiennent différentes concentrations de Sérum Albumine Bovine diluée avec de l'eau MilliQ pour obtenir un volume final de 20 µl en utilisant 1, 2, 5, 10, 20 µg d'une solution mère de BSA à 1µg/µl.

10µl de S9 sont distribués dans les cuvettes pour les échantillons. 10 µl d'eau MilliQ sont ajoutés pour obtenir un volume final de 20 µl. 480 µl d'eau MilliQ sont ajoutés aux cuvettes contenant la BSA et aux cuvettes contenant les échantillons. 500µl de réactif de Pierce sont distribués dans toutes les cuvettes.

La densité optique à 595 nm est lue contre un blanc contenant uniquement les réactifs sans le surnageant S9. La courbe d'étalonnage de la BSA est tracée et la concentration en protéines est évaluée d'après la courbe de régression.

4.1.6 Détermination de l'éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD) (Suteau *et al.*, 1988).

4.1.6.1 Préparation

Ajouter successivement dans un tube :

- 1/100 de volume d'éthoxyrésorufine (provenant d'une solution mère 123 µM dans du DMSO)
- 1/10 de volume de glucose-6-phosphate (25 mM dans H₂O)
- 1/10 de volume de NADPH (25mM dans H₂O)

Compléter le mélange au volume désiré avec la solution D. Ajouter la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G-6-PDH) pour obtenir une concentration finale de 1 unité. ml⁻¹. Chauffer le milieu pendant 5 minutes à 30°C dans un bain marie.

4.1.6.2 Réaction enzymatique

Pendant que le milieu décrit ci-dessus chauffe, distribuer les échantillons de S9 (10 à 100 µg dans la solution C) dans des tubes Falcon 2018 en polypropylène.

Pour chaque échantillon, faire en double un temps "zéro" et un temps "cinq".

Pour faire le temps "zéro" de la réaction, ajouter 2 ml d'acétone froide sur le S9.

Transférer tous les tubes dans le bain marie et toutes les 20 secondes ajouter 1 ml de milieu chaud aux échantillons et au temps "zéro" de la réaction en utilisant une Multipette Eppendorf montée avec une seringue de 50 ml. Passer immédiatement les tubes au vortex.

Arrêter la réaction après 5 minutes en ajoutant 2 ml d'acétone froide sauf dans le tube du temps "zéro" de la réaction. Passer à nouveau les tubes au vortex.

Centrifuger les échantillons pendant 5 min à 6 000 x g pour éliminer les protéines qui ont précipité.

4.1.6.3 Quantification de la résorufine produite

Après avoir vérifié le coefficient d'extinction de la résorufine standard, ajouter 100 pmoles de résorufine dans un nouveau tube (en utilisant 5 µl d'une solution standard de résorufine 2 mM dans du diméthyle sulfoxyde, diluée 100 fois dans la solution C). Ajouter 1 ml de milieu de réaction et 2 ml d'acétone froide. Passer au vortex.

Mesurer la fluorescence grâce à un spectrofluorimètre avec une longueur d'onde d'excitation à 537 nm et d'une longueur d'onde d'émission à 583 nm.

Transférer les échantillons avec précaution dans des cuvettes en laissant toutes les protéines qui ont précipitées.

Faire le blanc sur le tube du temps "zéro" de la réaction.

4.1.7 Calcul de l'activité

Pour le calcul de l'activité EROD exprimée en pmoles de résorufine/min/mg protéines, il est possible d'utiliser la formule suivante :

$$\text{Activité EROD} = (IF_c \times c \times VF) / (IF \times V_c \times t \times P)$$

où

IF_c est la fluorescence de l'échantillon

IF est la fluorescence du standard (nmol/ml)

c est la concentration du standard (nmol/ml)

VF est le volume final du mélange (ml)

V_c est le volume de l'échantillon (ml)

t est le temps de réaction

P est la concentration en protéines (mg/ml)

4.1.8 Interprétation des résultats

La mesure EROD est une façon pratique d'estimer l'activité catalytique P450 1A1 et fait l'objet d'un usage répandu dans les études de biosurveillance qui utilisent les poissons. L'analyse catalytique peut être considérée comme un premier test très utile pour identifier les réponses biologiques dues à une contamination par les HAP. L'existence de lésions hépatiques doit être notée; une idée intéressante est de conserver des échantillons représentatifs de tissu hépatique pour un examen histologique ultérieur. L'augmentation de la réponse EROD peut être confirmée en déterminant les adduits de HAP⁷ chez le poisson, ce qui met en évidence que la réponse EROD est bien causée par les composés xénobiotiques organiques aromatiques.

Il est important de suivre de près le protocole proposé car il est bien connu que des problèmes de standardisation pourraient apparaître en raison de: a) l'intercomparabilité des activités EROD dans le S9 et les fractions microsomales. Ceci a en effet souvent tendance à produire des résultats quelque peu ambigus. b) l'utilisation de différentes méthodes d'évaluation de la concentration en protéines selon les laboratoires. c) une question plus gênante est l'utilisation par les différents auteurs de différents coefficients d'extinction du produit de réaction –résorufine (phénoxazone)– qui varie de 2 à 73 mM⁻¹.cm⁻¹.

Donc si le but est de comparer et d'évaluer les valeurs EROD entre plusieurs laboratoires régionaux, il est important de parfaitement standardiser le test catalytique avant que toute biosurveillance soit mise en place.

4.1.9 Développements futurs

Une recherche est en cours pour détecter par immunochimie la réponse par induction du P450 en utilisant des sondes anticorps à la fois pour les niveaux de protéines et d'ARNm (Goksoyr *et al*, 1991a). De cette façon, la quantité de sonde anticorps spécifique réagissant de façon croisée avec la protéine P450 est mesurée chimiquement.

La détection immunochimique de l'ARNm peut s'avérer fortement avantageuse dans la mesure où l'activité catalytique du P450 induit (Gooch *et al*, 1989a) pourrait être inhibée par certains inducteurs (comme les organochlorés). En conséquence, l'analyse de l'activité catalytique seule pourrait ne pas montrer de réponse alors qu'une forte induction peut toujours être vue par analyse immunochimique de la protéine P450 ou de son ARNm. Apparemment, différents types d'inducteurs peuvent aussi moduler l'activité catalytique comme certains composés endogènes. Dans d'autres cas, l'activité catalytique peut être perdue en

⁷ Les métabolites HAP ne sont pas indicateurs d'effets biologique *per se* mais peuvent constituer un marqueur sensible d'exposition à des taux biodisponibles dans l'environnement. La biodisponibilité en HAP peut varier de façon marquée dans différentes espèces de poissons vivant dans des environnements contaminés de façon similaire par les HAP.

raison d'une mauvaise conservation (par exemple dans les situations d'échantillonnage *in situ*), ou encore l'échantillon ou le tissu peuvent être trop petits pour donner une activité catalytique mesurable (comme avec les œufs de poissons ou les larves) (Goksoyr *et al.*, 1991b). Dans tous ces cas, l'immunodétection du P450 a permis de détecter des réponses d'induction, ce qui n'aurait pas été possible avec des mesures catalytique seules (Goksoyr *et al.*, 1991a).

5. ÉVALUATION DU NIVEAU DE MÉTALLOTHIONEINES (MT)

5.1. Généralités

La quantification en routine du niveau de métallothionéines se révèle souvent problématique en raison du manque d'activité biologique mesurable de cette métalloprotéine. Ceci a contraint les chercheurs à examiner les caractéristiques structurales uniques de ces protéines et à les utiliser pour évaluer la concentration en métallothionéines. Les efforts de recherche se sont appuyés sur des estimations (1) de la teneur en métal lié à ces protéines (par exemple par déplacement compétitif du métal ou par des techniques de quantification directe) et (2) des caractéristiques physiques (par exemple par mesure d'absorption) et chimiques (par exemple par mesure des groupes sulphydryles et des affinités immunochimiques).

Chacune de ces approches présente ses forces et ses faiblesses. L'un des inconvénients principal commun à la plupart de ces méthodes est qu'il s'agit d'une estimation indirecte des métallothionéines, ce qui peut aboutir à des résultats contradictoires en ce qui concerne la valeur absolue de la concentration en métallothionéines dans les tissus. De plus, la plupart de ces méthodes nécessitent un équipement de laboratoire coûteux (par exemple ultracentrifugeuses, spectrophotomètre à absorption atomique, systèmes chromatographiques, etc.) et la préparation des échantillons et l'optimisation des tests exigent beaucoup de temps.

Les analyses de biologie moléculaire, comme la mesure de l'ARNm codant pour les MT fournissent quelque espoir pour développer une technique très sensible (Swapan *et al.*, 1991). Des tests immunologiques pour les métallothionéines sont disponibles mais la compatibilité limitée entre espèces relève un défi pour un développement futur (Kay *et al.*, 1991).

Récemment, des chercheurs ont adapté des techniques plus simples mais toujours exactes et sensibles pour quantifier les niveaux de métallothionéines dans les tissus biologiques.

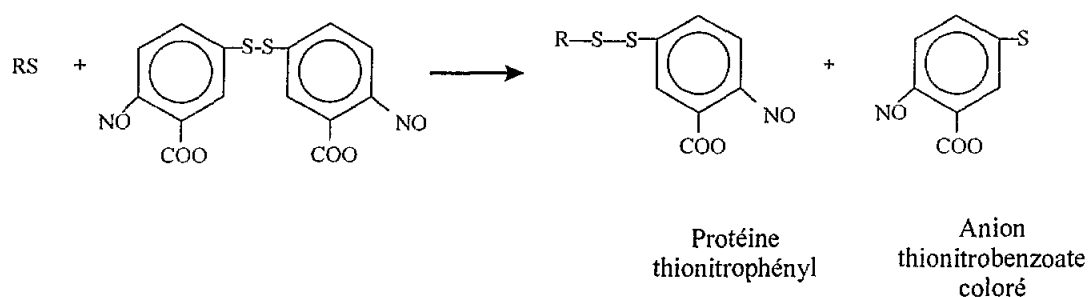
La méthodologie suivante est fondée sur l'estimation du contenu en groupes sulphydryles des protéines MT. Cette méthode a été présentée comme étant une technique sensible, faisant gagner du temps et peu coûteuse capable de détecter le contenu en métallothionéines dans les tissus d'organismes marins (Viarengo *et al.*, 1997). Elle est actuellement intercalibrée et standardisée par plusieurs laboratoires de la Méditerranée.

5.2 Détermination spectrophotométrique des groupes SH avec le réactif d'Ellman

5.2.1 Principe

La méthode décrite ici consiste en un fractionnement éthanol/chloroforme de la fraction cytosolique 30 000 x g dans le but d'obtenir une fraction partiellement purifiée en métallothionéines. La concentration en métallothionéines dans les échantillons est ensuite quantifiée en évaluant le contenu en résidus SH par une méthode spectrophotométrique utilisant le réactif d'Ellman (DTNB : 5,5 dithiobis 2 acide nitro benzoïque) (Ellman, 1959). Il est connu que les métallothionéines sont caractérisées par un contenu en cystéine extrêmement élevé (environ 20 à 30%) par rapport à d'autres protéines qui peuvent être présentes dans l'extrait éthanolique et donc la détermination en métallothionéines fondée sur la détection des résidus SH permet une évaluation plus sélective de ces métalloprotéines.

La réaction entre le DTNB et les groupements SH des protéines est illustrée ci-dessous. La réaction produit des quantités stœchiométriques de TNB (thionitrobenzoate), un composé jaunâtre ayant une densité optique maximale à 412 nm.



Ce procédé analytique a été adapté pour être utilisé chez les moules bien que d'autres organismes puissent être utilisés.

5.3 Évaluation pratique

Pour détecter le contenu en métallothionéines dans des tissus biologiques avec la réaction du DTNB, les échantillons doivent être préparés dans des conditions strictes de réduction (0,01% de β -mercaptoéthanol) comme décrit dans le protocole. Le fractionnement éthanol/chloroforme permet à la fois d'éliminer les thiols solubles de faible poids moléculaire, qui en réagissant avec le DTNB, pourraient interférer avec la quantification des métallothionéines, et de concentrer partiellement les métallothionéines dont le niveau dans les tissus d'animaux non contaminés est souvent bas. Lors du fractionnement éthanolique, l'addition d'ARN (comme coprécipitant) et d'acide est essentielle pour permettre une récupération quantitative des métallothionéines. Un "rinçage" final des extraits de métallothionéines élimine la contamination par les thiols comme les agents réducteurs présents dans les cellules (glutathion, cystéine etc.) ou par les thiols ajoutés lors de la préparation de

l'échantillon (β -mercaptoéthanol). Le culot concentré de métallothionéines est remis en suspension dans du NaCl 0,25 M avec en plus de l'HCl et de l'EDTA (afin d'éliminer les cations de métaux lourds encore liés aux métallothionéines), puis une quantité connue de réactif DTNB est ajoutée dans un milieu à forte force ionique (afin de complètement dénaturer les métallothionéines). Une courbe de calibration de glutathion réduit (GSH) ou de Cd, Zn thionéine (disponible dans le commerce) peut être utilisée pour quantifier le contenu en métallothionéines dans les tissus de mollusques. La densité optique est mesurée à 412 nm.

5.3.1 Équipement

- ultracentrifugeuse avec groupe réfrigérant (avec rotor oscillant et à angle fixe)
- spectrophotomètre
- homogénéisateur Potter en verre/téflon avec piston en téflon, avec moteur d'agitation
- congélateur
- bouteille d'azote liquide

5.3.2 Produits chimiques et solutions

- Tampon d'homogénéisation

Saccharose 0,5 M — Tris 20 mM, pH 8,6

Solution mère de leupeptine (1 mg/ml) (SIGMA L2884)

Solution mère éthanolique de phénylméthanesulfonyl fluorure (PMSF) (58mg/ml) (SIGMA P7626)

Au volume nécessaire de tampon Saccharose-Tris, ajouter 3,0 μ l/ml de leupeptine, 1,5 μ l/ml de PMSF, 0,1 μ l/ml de β -mercaptoéthanol (équivalent à 0,01%) (MERCK 805740).

- solution mère de GSH (SIGMA G 4521) : préparation juste avant l'analyse
- NaCl 0,25 M
- tampon phosphate 0,2 M, pH 8, contenant du NaCl 2 M (conserver à température ambiante)
- DTNB (SIGMA D8130)
- ARN (SIGMA R7250)(100 mg/ml) conserver à -20°C
- éthanol absolu froid (-20°C)
- chloroforme
- HCl 37%
- HCl 1 N / EDTA 4 mM (conserver à température ambiante)

5.3.3 Préparation des échantillons et de la fraction enrichie en MT

5.3.3.1 Homogénéisation

Disséquer rapidement les glandes digestives et les sécher sur du papier filtre de 3µm de porosité. Peser un lot de tissus appartenant à au moins 10 animaux et homogénéiser environ 1 g de tissu dans 3 volumes de tampon d'homogénéisation contenant le β-mercaptoéthanol, le PMSF et la leupeptine, par 8 allers-retours avec un Potter en verre/téflon monté sur un moteur.

5.3.3.2 Centrifugation

Centrifuger l'homogénat à 30 000 x g pendant 20 minutes pour obtenir une fraction soluble sans noyaux et sans mitochondries mais contenant les métallothionéines. Le rotor de la centrifugeuse doit être conservé à 0-4°C.

Note concernant la sécurité : équilibrer toujours les tubes avant de centrifuger. Utiliser des tubes (16 ml) PYREX® ou COREX® en verre ou en plastique très résistant aux solvants organiques.

5.3.3.3 Précipitation éthanolique

Précipiter les protéines de haut poids moléculaire présentes dans le surnageant en utilisant de l'éthanol absolu froid (-20°C). A 1 ml de surnageant 30 000 x g ajouter 1,05 ml d'éthanol absolu froid (-20°C) et 80 µl de chloroforme. Passer quelques secondes au vortex. Centrifuger avec un rotor oscillant ou à angle fixe à 6 000 x g pendant 10 min à 0-4°C. Récupérer le surnageant et mesurer le volume avec une pipette.

Ajouter au surnageant 6 000 x g 40µl d'HCl 37% et 10 µl d'une solution d'ARN (1mg/10 µl) puis 3 volumes d'éthanol froid. Conserver à -20°C pendant 1 heure.

Centrifuger à nouveau à 6 000g pendant 10 minutes avec un rotor oscillant. Éliminer le surnageant et laver le culot avec une solution (87:1:12, volume:volume) d'éthanol/chloroforme/tampon d'homogénéisation (froid, à -20°C) sans ajouter de β-mercaptoéthanol, de PMSF et de leupeptine.

Centrifuger pendant 10 minutes à 6 000 x g avec un rotor oscillant. Éliminer le surnageant et sécher le culot sous flux d'azote pendant environ 10 min.

Note : à toutes les étapes, tous les tubes doivent être conservés dans de la glace.

Note concernant la sécurité : Utiliser des tubes (16 ml) PYREX® ou COREX® en verre ou en plastique très résistant aux solvants organiques et acides.

5.3.3.4 Remise en suspension de la fraction enrichie en MT

Ajouter au culot 150 µl d'une solution de NaCl 0,25 M et 150 µl d'une solution composée d'HCl 1 N contenant 4 mM d'EDTA (solution de déstabilisation). Mettre un agitateur en verre dans le tube et passer au vortex pendant quelques secondes jusqu'à remise en suspension complète de l'échantillon.

5.3.4 Réaction avec le DTNB (réaction d'Ellman)

5.3.4.1 Courbe standard de référence glutathion

Préparer une solution mère de glutathion à une concentration de 1 mg/ml dans du NaCl 0,25 M. Conserver dans de la glace. Préparer 3 concentrations au moins de standard de référence GSH et un blanc selon le tableau 5.1 du paragraphe 5.3.4.2.

5.3.4.2 Détermination spectrophotométrique des MT

Juste avant l'analyse, dissoudre du DTNB (7,14 mg/42ml) 0,43 mM dans du tampon phosphate 0,2M pH 8 contenant du NaCl 2 M. Conserver à l'obscurité à température ambiante.

Ajouter au blanc, aux standards et aux échantillons 4,2 ml de solution de DTNB. Centrifuger les échantillons contenant les métallothionéines à 3 000 x g pendant 5 minutes à température ambiante.

Mesurer la densité optique, ABS_{412} avec un spectrophotomètre à 412 nm et en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme standard de référence.

	Solution mère de GSH	NaCl 0,25 M	HCl 1N EDTA 4mM	Solution de DTNB	Volume final
Échantillons test	-	150 µl	150 µl	4,2 ml	4,5 ml
Blanc	-	150 µl	150 µl	4,2 ml	4,5 ml
Standard 20 (14,4 nmol/ml)	20 µl	130 µl	150 µl	4,2 ml	4,5 ml
Standard 40 (28,8 nmol/ml)	40 µl	110 µl	150 µl	4,2 ml	4,5 ml
Standard 80 (57,6 nmol/ml)	80 µl	70 µl	150 µl	4,2 ml	4,5 ml

5.3.5 Calcul et interprétation des résultats

5.3.5.1 Tracé de la courbe standard

Exprimer le standard de référence glutathion en nmol/ml.

Tracer la courbe standard dans laquelle ABS_{412}^{GSH} est une fonction linéaire de la concentration en GSH (nmol/ml).

$$ABS = \varepsilon [-SH]$$

où (les unités de mesure sont entre parenthèses) :

ABS_{412}^{GSH} , (DO_{412}) est la Densité Optique des échantillons de GSH à 412 nm,
 ε , ($DO_{412}/nmol/ml$), est une constante représentant le coefficient d'extinction de la GSH,
 $[-SH]$, (nmol/ml) représente la concentration en groupements sylphydrides des échantillons de GSH.

5.3.5.2 Détermination quantitative du contenu en MT

Interpoler les valeurs d'obtenues à partir des échantillons de métallothionéines sur la courbe de référence. Les valeurs correspondantes trouvées sur l'axe des abscisses représentent les concentrations en groupements sulphydryles appartenant aux métallothionéines présentes dans les échantillons. En considérant les caractéristiques moléculaires de la métallothionéine de moules (Mackay *et al.*, 1993) pour laquelle le nombre de résidus cystéine est de 21, le poids moléculaire de 8 600 DA, le volume final de la réaction avec le DTNB (4,5ml) et le facteur de dilution de l'homogénat (4), la concentration en métallothionéines de moules peut être obtenue en utilisant la formule suivante :

$$[x/21]*8\ 600*4,5*4$$

où

x (nmol/ml) représente la valeur de l'axe des x à partir de l'interpolation de la valeur ABS_{412}^{GSH} sur la courbe de référence.

De façon alternative, il est possible de déterminer graphiquement ou par l'utilisation d'un logiciel spécifique (comme Microsoft Excel®) l'équation du paragraphe 5.3.5.1 et la formule suivante pour déterminer le contenu en métallothionéines (ng/g tissu poids : poids) dans les échantillons :

$$[(ABS_{412}^{MT}/\varepsilon_{GSH})/21]*8\ 600*4,5*4 \quad (1)$$

où

ABS_{412}^{MT} est la DO lue pour l'échantillon de métallothionéines
 ε_{GSH} est une constante représentant le coefficient d'extinction de la GSH

21 est le nombre de résidus cystéine de la métallothionéine de moule (Mackay *et al.*, 1993)

8 600 est le poids moléculaire de la métallothionéine de moule

4,5 (ml) est le volume final de la réaction avec le DTNB

4 est le facteur de dilution de l'homogénat

En simplifiant, l'équation (1) devient :

$$(\text{ABS}_{412}^{\text{MT}}/\varepsilon_{\text{GSH}})*7,37*10^3 \quad (2)$$

Un niveau plus élevé en contenu sulphydryles ($\equiv$ MT) par rapport au niveau de base de référence préexistant dans des échantillons provenant d'échantillons de référence non pollués indiquerait généralement la présence d'un stress de pollution dû aux métaux chez les animaux provenant du site d'échantillonnage. Cependant pour les raisons déjà évoquées dans l'introduction de ce manuel, des niveaux élevés de MT peuvent aussi être reliés à d'autres facteurs qui influencent leur synthèse. Pour une approche correcte dans l'utilisation des métallothionéines comme biomarqueurs d'exposition à une pollution par les métaux lourds, (Viarengo *et al.* sous presse).

Des zones côtières où les organismes présentent des niveaux plus élevés en MT que ceux appartenant à des zones non polluées doivent être plus profondément étudiées. Dans ce cas une analyse chimique du biota et des sédiments est nécessaire pour identifier le type de métal impliqué dans la zone concernée. Il serait donc judicieux de réserver un lot d'échantillons pour l'analyse des métaux.

6. BIBLIOGRAPHIE

- Addison, R.F. and A.J. Edwards (1988), Hepatic microsomal mono-oxygenase activity in flounder *Platichthys flesus* from polluted sites in Langesundfjord and from mesocosms experimentally dosed with diesel oil and copper. MEPS Special - Biological Effects of Pollutants: Results of a practical workshop. *Mar.Ecol.Prog.Ser.*, 46:51-54
- Bolognesi, C., M. Parrini, P. Roggeri, C. Ercolini and C. Pellegrino (1991), Carcinogenic and mutagenic pollutants: Impact on marine organisms. Proceedings of the FAO/UNEP/IOC Workshop on the biological effects of pollutants on marine organisms (Malta, 10-14 September 1991). MAP Technical Reports Series No. 69, UNEP, Athens, pp.113-121
- Bradford, M. (1976), A rapid and sensitive assay of protein utilizing the principle of dye binding. *Anal.Biochem.*, 72:248-264
- Brouwer, M. and T.H. Brouwer (1998), Biochemical defense mechanisms against copper-induced oxidative damage in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Arch.Biochem.Biophys.*, 351(2):257-264

- Brouwer, M., P. Whaling and D.W. Engel (1986), Copper-MT in the American lobster: Potential role of Cu(I) donors to apohemocyanin. *Env.Health Persp.*, 65:93-100
- Burke, M.D. and R.T. Mayer (1983), Differential effects of phenobarbitone and 3-methylcholanthrene induction on the hepatic microsomal metabolism and cytochrome P-450-binding of phenoxazone and a homologous series of its n-alkyl ethers (alkoxyresorufins). *Chem.Biol.Interact.*, 45:243-258
- Cassar, G. and V. Axiak (1994), Effects of tributyltin on ethoxyresorufin-o-deethylase *in vivo* in seabream. Proceedings of the European Society for Comparative Physiology and Biochemistry. 15th Conference: Biochemical and Physiological Effects of Pollutants and Toxicological Assessment of Environmental Quality. Genova, Italy, 127 p.
- Cesarone, C.F., C. Bolognesi and L. Santi (1979), Improved microfluorimetric DNA determination in biological material using 33258 Hoechst. *Anal.Biochem.*, 100:188-197
- Dixon, D.R. (1983), Sister chromatid exchange and mutagens in the aquatic environment. *Mar.Pollut.Bull.*, 14:282
- Eichorn, G.L. (1973), Complexes of polynucleotides and nucleic acids. Inorganic Biochemistry, edited by G.L. Eichorn, Amsterdam, Elsevier Scientific, Vol. 2 pp.1210-1245
- Ellman, G.L. (1959), Tissue sulphydryl groups. *Arch. Biochem.Bioph.*, 82:70-77
- Engel, D.W. (1988), The effect of biological variability on monitoring strategies: Metallothioneins as an example. *Water Res.Bull.*, 24:981-937
- Erickson, L.C., R. Osieka, N.A. Sharkey and K.W. Kohn (1980), Measurement of DNA damage in unlabelled mammalian cells analysed by alkaline elution and a fluorometric DNA assay. *Anal.Biochem.*, 106:169-174
- Forlin, L. and T. Andersson (1985), Storage conditions of rainbow trout liver cytochrome P-450 and conjugating enzymes. *Comp.Biochem.Physiol.*, 80B:569-572
- Galdies, C. (1995), The use of specific stress indices for Cu and Zn pollution monitoring of coastal waters. Unpublished MSc thesis, University of Malta
- Garrigues, P., C. Raoux, P. Lemaire, D. Ribera, A. Mathieu, J.F. Narbonne and M. Lafaurie (1990), *In situ* correlation between PAH and PAH-metabolizing system activities in mussels and fish in the Mediterranean Sea: Preliminary results. *Int.J.Analyt.Chem.*, 38:379-387

- George, S.G. and Per-Erik Olsson (1994), Metallothioneins as indicators of trace metal pollution in Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries, edited by J.M. Kees. Boca Raton, FL 33431, Kramer CRC Press Inc., pp.151-171
- Goering, P.L. and C.D. Klaassen (1984), Tolerance to Cd-induced toxicity depends on pre-synthesized MT in liver. *J.Toxicol.Environ.Health.*, 14:803-812
- Goksoyr, A. and L. Forlin (1992), The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquat.Toxicol.*, 22:287-312
- Goksoyr, A., H.E. Larsen and A.-M. Husoy (1991a), Application of a cytochrome P-450IA1-ELISA in environmental monitoring and toxicological testing of fish. *Comp.Biochem.Physiol.*, 100C(1/2):157-160
- Goksoyr, A. T.S. Solberg and A.-M. Husoy (1991b), immunochemical detection of cytochrome P-450IA1 induction in cod (*Gadus morhua*) larvae and juveniles exposed to a water soluble fraction of North Sea crude oil. *Mar.Pollut.Bull.*, 22:122-129
- Gooch, J.W., A.A. Elskus, P.J. Kloepper-Sams, M.E. Hahn and J.J. Stegeman (1989), Effects of ortho- and non-ortho-substituted polychlorinated biphenyl congeners on the hepatic mono-oxygenase system in scup (*Stenotomus chrysops*). *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 98:422-433
- Hamer, D.H. (1986), Metallothionein. *Annu.Rev.Biochem.*, 55:913-951
- Hamer, D.H., D.J. Thiele and J.E. Lemont (1985), Function and autoregulation of yeast copperthionein. *Science*, 228:685-690
- Heidelberger, C. (1973), Current trends in chemical carcinogenesis. *Fed.Proc.*, 32:2154-2161
- Karin, M. (1985), Metallothioneins: Proteins in search of function. *Cell*, 41:9-10
- Kay, J., A. Cryer, B.M. Darke, P. Kille, W.E. Lees, C.G. Norey and J.M. Stark (1991). *Int.J.Biochem.*, 23:1-5
- Kloepper-Sams, P.J. and J.J. Stegeman (1989), The temporal relationships between P-450E protein content, catalytic activity and m-RNA levels in the teleost *Fundulus heteroclitus* following treatment with β -naphthoflavone. *Arch. Biochem.Bioph.*, 268:525-535
- Langston, W.J., M.J. Bebianno and Z. Mingjiang (1989), Metal-binding proteins and Cd in marine molluscs. *Mar.Environ.Res.*, 28:195-200

- Lohse, J. (1990), Distribution of organochlorine pollutants in North Sea sediments. International Conference on North sea Pollution - technical Strategies for improvement IAWPRC, EWPCA, NVA, Amsterdam, pp.227-236
- Lowe, D., M.N. Moore and B.M. Evans (1992), Contaminant impact on interactions of molecular probes with lysosomes in living hepatocytes from dab *Limanda limanda*. *Mar.Ecol.Progr.Ser.*, 91:135-140
- Lowe, D.M., C. Soverchia and M.M. Moore (1995), Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. *Aquatic Toxicol.*, 33:105-112
- Mackay, E.A., Overnell, J., Dunbar, B., Davidson, I., Hunziker, P.E., Kägi, J.H.R., Fothergill, J.E. (1993). Complete amino acid sequence of five dimeric and four monomeric forms of metallothionein from the edible mussel *Mytilus edulis*. *Eur.J.Biochem.*, 218:183-194
- Mathieu, A., P. Lemaire, S. Carriere, P. Draï, J. Giudicelli and M. Lafaurie (1991), Seasonal and sex-linked variations in hepatic and extrahepatic biotransformation activities in striped mullet (*Mullus barbatus*) *Ecotox.Env.Safety*, 22:45-47
- Meyn, R.E. and W.T. Jenkins (1983), Variation in normal and tumor tissue sensitivity of mice to ionizing radiation-induced DNA strand breaks *in vivo*. *Cancer Res.*, 43:5668-5673
- Moore, M.N. (1985), Cellular responses to pollutants. *Mar.Pollut.Bull.*, 16:134-139
- Moore, M.N. (1990), Lysosomal cytochemistry in marine environmental monitoring. *Histochem.J.*, 22:187-191
- Narbonne, J.F., P. Garrigues, D. Ribera, C. Raoux, A. Mathieu, P. Lemaire, J.P. Salaun and M. Lafaurie (1991), Mixed-function oxygenase enzymes as tools for pollution monitoring: field studies on the French coast of the Mediterranean sea. *Comp.Biochem.Physiol.*, 100C:37-42
- Nikunen, E. (1985), Toxic impact of effluents from petrochemical industry. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 9:84-91
- Ohkuma, S., Y. Moriyama and T. Takano (1982), Identification and characterisation of a proton pump on lysosomes by fluorescein isothiocyanate-dextran fluorescence. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 79:2758-2762
- Payne, J.F. (1977), Mixed function oxidase s in marine organisms in relation to petroleum hydrocarbon metabolism and detection. *Mar.Pollut.Bull.*, 8:112-116

- Pavicic, J., B. Raspor and M. Branica (1991), Metal binding proteins of *Mytilus galloprovincialis*, similar to metallothioneins, as a potential indicator of metal pollution. Proceedings of the FAO/UNEP/IOC Workshop on the biological effects of pollutants on marine organisms (Malta, 10-14 September 1991). MAP Technical Reports Series No. 69, UNEP, Athens, pp.217-234
- Roesijadi, G, R. Bogumil, M. Vasak and J.H. Kagi (1998), Modulation of DNA binding of a tramtrack zinc finger peptide by the metallothionein-thionein conjugate pair. *J.Biol.Chem.*, 273:17425-17432
- Scarpato, R., L. Migliore, G. Alfinito-Cognetti and R. Barale (1990), Induction of micronuclei in gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* exposed to polluted marine waters *Mar.Pollut.Bull.*, 21:74-80
- Segien, P.O. (1983), Inhibitors of lysosomal function. *Meth. Enzymol.*, 96:737-765
- Selli, A., C. Nasci, C. Pagnucco, R. Montanari and G.P. Serrazenatti (1994), Mono-oxygenase system and antioxidant enzymes in the bivalve mollusc *Scapharca inaequivalvis* from the Emilia-Romagna coast. Proceedings of the Biochemical and Physiological Effects of Pollutants and Toxicological Assessment of Environmental Quality. Genova, Italy, 146 p.
- Shugart, L. (1988), An alkaline unwinding assay for the detection of DNA damage in aquatic organisms. *Mar.Environ.Res.*, 24:321
- Speigel, M.R. (1961), Statistics. *Schaum's Outline Series. Mc Graw-Hill Book Company*, 359 p.
- Stegeman, J.J. (1989), Cytochrome P-450 forms in fish: catalytic, immunological and sequence similarities. *Xenobiotica*, 19:1093-1110
- Stegeman, J.J., P.J. Klopffer-Sams and J.W. Farrington (1986), Mono-oxygenase induction and chlorobiphenyls in the deep-sea fish *Coryphaenoides armatus*. *Science*, (Washington, DC) 231:1287-1289
- Suteau, P., M. Daubeze, M.L. Migaud and J.F. Narbonne (1988), PAH-metabolizing enzymes in whole mussels as biochemical tests for chemical pollution monitoring. MEPS Special - Biological Effects of Pollutants: results of a practical workshop. *Mar.Ecol.Prog.Ser.*, 46:45-49
- Swapan, K. De, G.C. Enders and G.K. Andrews (1991), High levels of metallothionein messenger RNAs in male germ cells of the adult mouse in *Molec.Endocrin.*, Vol. 5, No 5, pp.628-636

- Tambutté, S., E. Tambutté, P. Rolland and M.-C Van Klaveren (1998), A biomonitoring program of the coastal area of the Principality of Monaco. International Symposium on Marine Pollution. Monaco, 5-9 October 1998. IEAE-SM-354/228 p.
- Thornalley, P.T. and M. Vasak (1985), Possible role for MT in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim.Biophys.Acta*, 827:36
- PNUE (1997a), The MED POL Biomonitoring Programme Concerning the Effects of Pollutants on Marine Organisms Along the Mediterranean Coasts. UNEP(OCA)/MED WG.132/3, Athens, 15 p. (mimeo)
- PNUE (1997b), Rapport de la réunion d'experts chargés d'examiner le programme de biosurveillance MED POL. UNEP(OCA)/MED WG.132/7, Athènes, 21 p. (mimeo)
- PNUE/FAO/AIEA (1993), Conception des programmes de surveillance continue et de gestion des données concernant les contaminants chimiques dans les organismes marins. Série des rapports techniques du PAM No. 77. PNUE, Athènes, 236 p.
- Viarengo, A. and L. Canesi (1991), Mussels as biological indicators of pollution, *Aquaculture*, 94:225-243
- Viarengo, A., M.N. Moore, G. Mancinelli, A. Mazzucotelli, P.K. Pipe and S.V. Farrar (1987), Metallothioneins and lysosomes in metal toxicity and accumulation in marine mussels: the effect of cadmium in the presence and absence of phenanthrene. *Mar.Biol.* , 94:251-257
- Viarengo, A., G. Mancinelli, G. Martino, M. Pertica, L. Canesi and A. Mazzucotelli (1988a), Integrated stress indices in trace metal contamination: critical evaluation in a field study. MEPS Special - Biological Effects of Pollutants: Results of a Practical Workshop. *Mar.Ecol.Progr.Ser.*, 46:65-70
- Viarengo, A., G. Mancinelli, M. Orunesu, G. Martino, F. Faranda and A. Mazzucotelli (1988b), Effects of sublethal copper concentrations, temperature, salinity and oxygen levels on calcium content and on cellular distribution of copper in the gills of *Mytilus galloprovincialis* Lam.: a multifactorial experiment. *Mar.Environ.Res*, 24:227-231

- Viarengo, A., Bettella, R. Fabbri, M. Lafaurie and X. Stien (1994), Heavy metal inhibition of EROD activity in liver microsomal preparation of *Dicentrarchus labrax* exposed to organic xenobiotics: role of GSH in the reduction of heavy metal effects. Proceedings of the European Society for Comparative Physiology and Biochemistry. 15th Conference: Biochemical and Physiological Effects of Pollutants and Toxicological Assessment of Environmental Quality. Genova, Italy, 121 p.
- Viarengo, A., E. Ponzano, F. Dondero and R. Fabbri (1997), A simple spectrophotometric method for MT evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Mar. Environ. Res.* 44:69-84
- Viarengo, A., B. Burlando, F. Dondero, A. Marro and R. Fabbri (in press), Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. *Biomarkers*



Issued and printed by:

Mediterranean Action Plan
United Nations Environment Programme

Additional copies of this and other publications issued by
the Mediterranean Action Plan of UNEP can be obtained from:

Coordinating Unit for the Mediterranean Action Plan
United Nations Environment Programme
Leoforos Vassileos Konstantinou, 48
P.O.Box 18019
11610 Athens
GREECE



Publié et imprimé par:

Plan d'action pour la Méditerranée
Programme des Nations Unies pour l'Environnement

Des exemplaires de ce document ainsi que d'autres
publications du Plan d'action pour la Méditerranée
du PNUE peuvent être obtenus de:

Unité de coordination du Plan d'action pour la Méditerranée
Programme des Nations Unies pour l'Environnement
Leoforos Vassileos Konstantinou, 48
B.P. 18019
11610 Athènes
GRECE