



Plan d'action pour
la Méditerranée
**Convention de
Barcelone**

30 août 2021
Français
Original : anglais

Réunion des points focaux du MED POL

Vidéoconférence, 27-28 mai et 6-7 octobre 2021

Point 12 de l'ordre du jour : Harmonisation et normalisation de la surveillance du cluster IMAP Pollution

- a) Directives / protocoles de suivi pour les indicateurs communs IMAP 13, 14, 17, 18, 20 et 23
- b) Directives / protocoles de surveillance pour l'assurance qualité analytique et la communication des données de surveillance pour les indicateurs communs IMAP 13, 14, 17, 18 et 20
- c) Directives / protocoles de surveillance pour les microplastiques flottants

Lignes directrices et protocoles de surveillance pour l'échantillonnage et la conservation des échantillons de mollusques marins (tels que *Mytilus* sp.) et de poissons (tels que *Mullus barbatus*) pour l'indicateur commun 18 de l'IMAP

Pour des raisons environnementales et économiques, le tirage du présent document a été restreint. Les participants sont priés d'apporter leur copie à la réunion et de ne pas demander de copies supplémentaires.

Table des matières

1	Introduction.....	1
2	Note technique pour l'échantillonnage et la conservation des mollusques marins (tels que <i>Mytilus</i> sp.) pour l'analyse des biomarqueurs	2
2.1	Protocole pour la collecte et le transport des mollusques marins (tels que <i>Mytilus</i> sp.)	3
2.2	Protocole pour la dissection et la conservation des échantillons de tissus de mollusques marins (tels que <i>Mytilus</i> sp.).....	5
3	Note technique pour l'échantillonnage et la conservation des poissons marins (<i>Mullus barbatus</i>) pour l'analyse des biomarqueurs	8
3.1	Protocole pour la collecte de poissons marins (<i>Mullus barbatus</i>).....	9
3.2	Protocole pour la dissection et la conservation des échantillons de tissus de poissons marins (<i>Mullus barbatus</i>)	10

Annexe I : Références

Note du Secrétariat

Conformément au programme de travail 2020-2021 adopté par la COP21, le programme PNUE/PAM - MED POL a préparé les lignes directrices de surveillance relatives à l'indicateur commun 18 de l'IMAP, ainsi que les lignes directrices de surveillance relatives à l'assurance de la qualité et à la communication des données.

Avec l'ensemble des Lignes directrices de surveillance relatives aux indicateurs communs 13, 14, 17 et 20 de l'IMAP examinées par les Réunions intégrées des Groupes de correspondance sur la Surveillance de l'Approche écosystémique (1-3 décembre 2020), ces nouvelles lignes directrices de surveillance constituent un manuel cohérent destiné à guider le personnel technique des laboratoires compétents IMAP des Parties contractantes pour la mise en œuvre de pratiques de surveillance normalisées et harmonisées liées à un indicateur commun IMAP spécifique (c'est-à-dire les méthodes d'échantillonnage, de conservation et de transport des échantillons, la préparation et l'analyse des échantillons, ainsi que l'assurance qualité et la communication des données de surveillance). Ces lignes directrices présentent un résumé des meilleures pratiques connues disponibles et utilisées dans la surveillance du milieu marin, en rassemblant des pratiques analytiques globales intégrées afin de garantir la représentativité et l'exactitude des résultats analytiques nécessaires à la production de données de surveillance de qualité assurée.

Les Lignes directrices/Protocoles de surveillance s'appuient sur les connaissances et les pratiques acquises au cours de 40 années de mise en œuvre de la surveillance du POL MED et sur des publications récentes, mettant en évidence les pratiques actuelles des laboratoires marins des Parties contractantes, ainsi que d'autres expériences pertinentes.

Cette Directive de surveillance pour l'échantillonnage et la conservation des échantillons de mollusques marins (tels que *Mytilus* sp.) et de poissons (tels que *Mullus barbatus*) pour l'indicateur commun 18 de l'IMAP fournit les deux notes techniques suivantes :

- 1) Note technique pour l'échantillonnage et la conservation des échantillons de mollusques marins (tels que *Mytilus* sp.) pour l'analyse des biomarqueurs, qui comprend les deux protocoles suivants :
 - i) Protocole pour la collecte et le transport des mollusques marins (tels que *Mytilus* sp.)
 - ii) Protocole pour la dissection et la conservation des échantillons de tissus de mollusques marins (tels que *Mytilus* sp.) ;
- 2) Note technique pour l'échantillonnage et la conservation des échantillons de poissons marins (tels que *Mullus barbatus*) pour l'analyse des biomarqueurs, qui comprend les deux protocoles suivants :
 - i) Protocole pour la collecte de poissons marins (tels que *Mullus barbatus*)
 - ii) Protocole pour la dissection et la conservation des échantillons de tissus de poissons marins (tels que *Mullus barbatus*).

Les Lignes directrices/Protocoles de surveillance, y compris celui-ci relatif à l'échantillonnage et à la préservation de Mollusques marins (tels que *Mytilus* sp.) et de Poissons (tels que *Mullus barbatus*), établissent une base solide pour une mise à jour régulière des pratiques de surveillance en vue d'une mise en œuvre réussie de l'IMAP.

La réunion de la CorMon sur la surveillance de la pollution (26-28 avril 2021) a examiné les méthodes et pratiques de surveillance élaborées pour l'échantillonnage et la conservation et le transport des échantillons, comme indiqué dans le document UNEP/MED WG.492/3, et a recommandé la soumission du document révisé (UNEP/MED WG. 509/27) pour examen par la Réunion des points focaux du MED POL. Suite à la conclusion adoptée par la Réunion des CORMON sur la surveillance de la pollution, le document révisé contient les changements introduits pour tenir compte des propositions techniques de la France, de l'Espagne et de l'Italie, qui ont été convenues lors de la Réunion. Les changements sont indiqués en mode de suivi des modifications dans le présent document de réunion, tandis que leur contenu détaillé et les réponses du Secrétariat à cet égard figurent dans le document UNEP/MED WG.509/Inf.20.

List des abréviations / acronymes

AChE	Acétylcholinestérase
CI	Indicateur commun
CInd	Indice de condition
COP	Conférence des parties
CORMON	Groupe de correspondance de l'approche écosystémique sur la surveillance
EcAp	Approche écosystémique
AEE	Agence européenne pour l'environnement
CE	Commission européenne
UE	Union européenne
FAO	Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
BEE	Bon état écologique
HELCOM	Commission pour la protection du milieu marin dans la zone de la mer Baltique – Commission d'Helsinki
AIEA	Agence internationale de l'énergie atomique
IMAP	Programme de surveillance et d'évaluation intégrées de la mer et des côtes méditerranéennes et critères d'évaluation connexes
LMS	Stabilité de la membrane lysosomale
PAM	Plan d'action pour la Méditerranée
MED POL	Programme coordonné de surveillance continue et de recherche en matière de pollution dans la Méditerranée
MED QSR	Rapport sur l'état de la qualité de la Méditerranée
MNi	Micronoyaux
OSPAR	Convention pour la protection du milieu marin de l'Atlantique du Nord-Est
AQ/CQ	Assurance qualité/Contrôle qualité
SoS	Stress on stress

1 Introduction

1. Un aspect fondamental lié à l'objectif écologique 9 de l'IMAP concerne la surveillance des concentrations de différentes classes de produits chimiques nocifs évaluées dans les matrices pertinentes, c'est-à-dire les sédiments, l'eau de mer et le biote (CI 17). Ces données doivent être associées aux résultats concernant le niveau des effets biologiques des contaminants toxiques qui peuvent être présents dans le milieu marin lorsqu'une relation de cause à effet a été établie (CI 18).
2. Dès la phase initiale du programme de surveillance PNUE/PAM-MED POL, il a été décidé de tenter de mettre en évidence les premiers effets des contaminants toxiques sur la vie marine en utilisant des biomarqueurs, c'est-à-dire des paramètres biologiques dont les variations peuvent mettre en évidence un syndrome de stress induit par les polluants chez les organismes étudiés.
3. Au stade actuel de la mise en œuvre d'IMAP, les biomarqueurs suivants sont sélectionnés pour un suivi régulier¹ : a) stabilité de la membrane lysosomale (LMS), un biomarqueur capable de mettre en évidence une autophagie accrue, un diagnostic des effets des produits chimiques toxiques et un pronostic des effets possibles au niveau de la population ; b) activité de l'acétylcholinestérase (AChE), un biomarqueur diagnostic des effets neurotoxiques possibles ; c) la fréquence des micronoyaux (MNi), un biomarqueur capable de mettre en évidence les effets génotoxiques des contaminants ; et d) Stress on stress (SoS), un biomarqueur non obligatoire adapté pour révéler la capacité réduite des organismes à survivre à l'action d'autres facteurs de stress environnementaux.
4. Ces biomarqueurs peuvent être utilisés dans de nombreux organismes différents. Cependant, pour assurer la comparabilité des résultats obtenus, les mollusques (tels que *Mytilus* sp.) et les poissons (tels que *Mullus barbatus*) ont donc été sélectionnés pour l'analyse des biomarqueurs². Il convient de noter que la LMS chez le *Mullus barbatus* peut être considérée comme un paramètre obligatoire uniquement si les capacités sont suffisamment renforcées par la comparaison interlaboratoires pour garantir l'utilisation correcte de ce biomarqueur.
5. Un aspect important pour la collecte des animaux est que les mollusques et les poissons doivent être des organismes vivants, non stressés par la procédure de collecte et la manipulation/le transport avant d'être disséqués, pour obtenir les tissus utilisés pour l'analyse biologique.
6. Ces lignes directrices/protocoles de surveillance fournissent des méthodologies appropriées pour l'échantillonnage et le transport de *Mytilus* sp. et de *Mullus barbatus*, ainsi que pour la préparation de leurs tissus dans des conditions contrôlées, afin de garantir la représentativité et l'intégrité des échantillons biologiques utilisés pour l'analyse des différents biomarqueurs, comme prévu dans les documents PNUE/MED WG. 492509/28 et PNUE/MED WG. 492509/29.

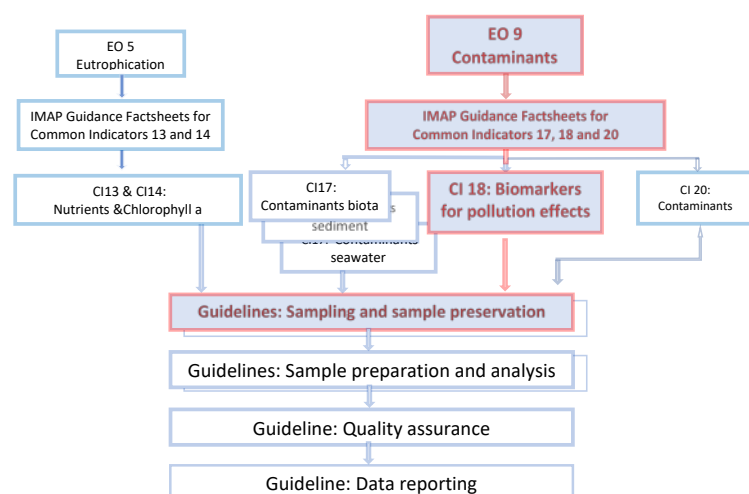


Diagramme de flux : Lignes directrices pour les objectifs écologiques 5 et 9 de l'IMAP

¹ UNEP/MAP (2019) UNEP/MED WG.467/5. IMAP Guidance Factsheets: Update for Common Indicators 13,14, 17, 18, 20 and 21: New proposal for candidate indicators 26 and 27.

2 Note technique pour l'échantillonnage et la conservation des mollusques marins (tels que *Mytilus* sp.) pour l'analyse des biomarqueurs

7. Les mollusques marins utilisés pour effectuer les évaluations toxicologiques des biomarqueurs doivent également être utilisés pour l'analyse chimique, comme décrit dans les lignes directrices/protocoles de surveillance pour l'échantillonnage et la préservation des échantillons de biote marin pour l'indicateur commun 17 de l'IMAP : éléments lourds et traces et contaminants organiques (PNUE/PAM WG. 482509/23). Dans la mesure du possible, les biomarqueurs et l'analyse chimique doivent être effectués sur les mêmes échantillons. Cela permettra une meilleure intégration de la surveillance des effets biologiques et des contaminants. Les mollusques doivent être vivants et maintenus dans de bonnes conditions. Les mollusques (*Mytilus* sp.) sont reconnus au niveau international depuis des décennies de recherche et de biosurveillance en tant qu'organismes idéaux pour la surveillance du milieu marin et du littoral (OSPAR 1997² ; PNUE, 1997³ ; PNUE/RAMOG, 1999⁴ ; Moore *et al.*, 2004⁵ ; Martínez-Gómez *et al.*, 2015⁶ ; Hansson *et al.*, 2017⁷ ; etc.). Les moules sont des mollusques intertidaux sessiles et filtrants, capables d'échantillonner en permanence la colonne d'eau et d'accumuler dans leurs tissus les substances chimiques présentes dans les fractions dissoutes et particulaires (Goldberg *et al.*, 1978⁸ ; Bayne, 2009⁹ ; Viarengo *et al.*, 2000¹⁰).

8. Dans les programmes de biosurveillance, ~~it is possible to use~~ l'échantillonnage des moules sauvages indigènes peut être organisé; toutefois, dans ce cas, il est important de savoir que les substances chimiques accumulées dans les tissus peuvent refléter des événements de pollution survenus des mois ou des années avant l'échantillonnage. En outre, dans le cas d'un vaste programme de surveillance, il est également important de tenir compte du fait que les moules de différentes populations peuvent avoir des taux de croissance et des stades de maturation des gonades différents en raison des conditions environnementales spécifiques des zones d'échantillonnage (c'est-à-dire la disponibilité de la nourriture, la température de l'eau de mer, la salinité, etc.) Par conséquent, lorsque l'on utilise des moules sauvages, il est recommandé d'évaluer le stade de développement des gonades des mollusques échantillonnés, un paramètre qui peut grandement modifier le statut physiologique des organismes.

9. Afin de réduire les problèmes d'échantillonnage que peut poser l'utilisation d'organismes sauvages, il est possible d'utiliser des moules d'élevage en cage (Viarengo *et al.*, 2007¹¹). Les animaux seront génétiquement homogènes (étant collectés dans la même ferme) et à un stade similaire de développement des gonades, car ils proviennent de la même population ; et la même taille correspondra au même âge des animaux. De plus, l'origine du contaminant sera minimale et similaire chez tous les animaux. Après un mois de mise en cage sur le site d'échantillonnage (c'est-à-dire une période qui garantit un stade de développement des gonades assez similaire chez les moules mises en cage sur les différents sites de la côte), les effets toxiques observés chez les moules seront directement liés à la quantité de produits chimiques nocifs accumulés dans les tissus des moules. Pour ces raisons, l'utilisation d'organismes en cage, lorsque cela est possible, est fortement recommandée ; toutefois, cela n'élimine pas l'échantillonnage des moules indigènes sauvages. Une durée d'exposition plus longue (2 mois ou plus) peut être appliquée ; cependant, dans ce cas, il faut évaluer le stade de

² OSPAR, 1997. JAMP Guidelines for General Biological Effects Monitoring (OSPAR Agreement 1997-7). OSPAR Commission, Monitoring guidelines. Ref. No: 1997-7. 20 pp.

³ UNEP, 1997. The MED POL Biomonitoring Programme Concerning the Effects of Pollutants on Marine Organisms Along the Mediterranean Coasts. UNEP(OCA)/MED WG.132/3, Athens.

⁴ UNEP/RAMOG: Manual on the Biomarkers Recommended for the MED POL Biomonitoring Programme. UNEP, Athens, 1999

⁵ Moore, M.N., Lowe, D. and Köhler, A. 2004. Biological effects of contaminants: Measurement of lysosomal membrane stability. ICES Techniques in Marine Environmental Sciences. No. 36. 39 pp.

⁶ Martínez-Gómez, C., Bignell, J. and Lowe, D., 2015. Lysosomal membrane stability in mussels. ICES Techniques in Marine Environmental Sciences No. 56. 41

⁷ Hansson, T., Thain, J., Martínez-Gómez, C., Hylland, K., Gubbins, M., Balk L., 2017. Supporting variables for biological effects measurements in fish and blue mussel. ICES Techniques in Marine Environmental Sciences. No. 60. 22 pp.
<http://doi.org/10.17895/ices.pub.2903>.

⁸ Goldberg, E.D., Bowen, V.T., Farrington, J.W., Harvey, G., Martin, J.H., Parker P.L., Risebrough, R.W., Robertson, W., Schneider, E., Gamble, E., 1978. The Mussel Watch. Environmental Conservation 5, 101-125.

⁹ Bayne, B.L., 2009. Marine Mussels: Their Ecology and Physiology. Cambridge University Press 528 p.

¹⁰ Viarengo, A.; Lafaurie, M.; Gabrielides, G.P.; Fabbri, R.; Marro, A.; Roméo, M., 2000. Critical evaluation of an intercalibration exercise undertaken in the framework of the MED POL biomonitoring program. Mar. Environ. Res. 49, 1-18.

¹¹ Viarengo, A., Dondero, F., Pampanin, D.M., Fabbri, R., Poggi, E., Malizia, M., Bolognesi, C., Perrone, E., Gollo, E., Cossa, G.P., 2007. A biomonitoring study assessing the residual biological effects of pollution caused by the HAVEN wreck on marine organisms in the Ligurian Sea (Italy). Arch Environ Contam Toxicol. 53, 607-616.

développement des gonades pour réduire les effets des facteurs de confusion. À cet égard, il est important de souligner que l'utilisation de moules en cage permet également d'évaluer leur taux de survie après un mois d'exposition dans les zones polluées : l'incidence de la mort des moules est un paramètre très important pour identifier facilement les zones extrêmement polluées, où la forte concentration de produits chimiques toxiques peut provoquer des altérations pathologiques mortelles chez les animaux.¹²

10. Les moules doivent être mises en cage dans des structures de confinement (par exemple, des sacs en polyéthylène ou, mieux encore, des sacs non plastiques montés sur des tubes en PVC) pendant une période de 30 jours (Sforzini *et al.*, 2018¹³). Il est important que les moules utilisées pour les expériences de mise en cage soient collectées sur un site propre, et ce avant de commencer l'expérience.

11. Dans le cadre de cette note technique, les lignes directrices pour la surveillance de l'échantillonnage et de la conservation des échantillons de mollusques marins (tels que *Mytilus* sp.) et de poissons (*Mullus barbatus*) pour l'indicateur commun 18 de l'IMAP fournissent les deux protocoles suivants : i) Protocole pour la collecte et le transport des mollusques marins (tels que *Mytilus* sp.) et ii) Protocole pour la dissection et le stockage des échantillons de tissus de mollusques marins (tels que *Mytilus* sp.).

2.1 Protocole pour la collecte et le transport des mollusques marins (tels que *Mytilus* sp.)

a. Collecte de moules

12. Les moules sont des organismes intertidaux et, par conséquent, la zone d'échantillonnage peut couvrir toute la longueur du littoral si des moules en cage sont utilisées. Dans le cas de l'échantillonnage de moules provenant de populations sauvages, seules les zones rocheuses seront adéquates pour l'installation de ces mollusques bivalves.

13. La fréquence suggérée d'échantillonnage des moules est d'une fois par an ; les périodes d'échantillonnage les plus adéquates se situent durant les mois post-hivernaux, mais avant ou après la période de frai. Habituellement, dans la plupart des zones côtières méditerranéennes, les deux périodes sont avril-juin et septembre-novembre ; mais les périodes d'échantillonnage peuvent varier en fonction des caractéristiques climatiques des différentes régions méditerranéennes (CIEM, 2011¹⁴ ; Moore *et al.*, 2004). La fréquence choisie pour les activités de biosurveillance est également conforme à la pratique exercée pendant la biosurveillance MED POL IV.

14. *M. galloprovincialis* est une espèce eurytherme affichant une tolérance à une large gamme de températures (du quasi-gel à ~ 31 °C). Des études physiologiques de *M. galloprovincialis* indiquent que sa tolérance thermique supérieure aiguë (indiquée par une insuffisance cardiaque) peut aller de 26 °C à 31 °C, selon la température d'acclimatation et la salinité (Braby et Somero, 2006¹⁵). Par conséquent, la période d'échantillonnage doit éviter les périodes où la température ambiante de l'eau de mer est supérieure à 24°C.

15. Les plongeurs doivent collecter les moules vivantes (sauvages ou en cage) manuellement à 5-7 m de profondeur. Les filaments du byssus des moules doivent être coupés du substrat, car le fait de tirer les animaux des rochers (enfilage) peut entraîner des dommages aux tissus internes et induire une réaction de stress supplémentaire chez les moules. Dans le cas où des moules vivant à l'interface eau/air sont utilisées, la contamination par des contaminants lipophiles présents à la surface de l'eau

¹²Il est à noter qu'une contrainte due aux sacs de mise en cage n'a pas été trouvée lors de la réalisation des activités de biosurveillance MED POL IV.

¹³ Sforzini S, Oliveri C, Orrù A, Chessa G, Jha A, Viarengo A, Banni M., 2018. Application of a new targeted low density microarray and conventional biomarkers to evaluate the health status of marine mussels: A field study in Sardinian coast, Italy. *Sci. Total Environ.* 628-629, 319-328.

¹⁴ ICES, 2011. Report of the Study Group on Integrated Monitoring of Contaminants and Biological Effects (SGIMC), 14-18 March 2011, Copenhagen, Denmark. ICES CM 2011/ACOM:30. 265 pp

¹⁵ Braby, C.E., Somero, G.N., 2006. Following the heart: temperature and salinity effects on heart rate in native and invasive species of blue mussels (genus *Mytilus*). *J. Exp. Biol.* 209, 2554-2566.

peut altérer l'évaluation des teneurs en produits chimiques dans les tissus mous des moules ; de plus, la plus grande variabilité de cet environnement peut influencer le statut physiologique des mollusques.

16. Les lots de moules (qu'il s'agisse d'animaux sauvages ou en cage) doivent présenter une taille de coquille standardisée, généralement de 4-5 à 7 cm. Un nombre suffisant de moules est nécessaire pour permettre l'analyse des biomarqueurs ; la collecte de 80 à 100 animaux est suggérée pour l'analyse de la stabilité de la membrane lysosomale (LMS), de la fréquence des micronoyaux (MNi), de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) et du stress on stress (SoS).

17. Pendant la collecte des moules, un rapport doit être préparé contenant toutes les informations relatives à l'échantillonnage, à savoir : a) les données d'échantillonnage (jour, mois et année), b) le nombre de mollusques échantillonnés, c) la profondeur de collecte (m), d) le géoréférencement (Lat/Long) (degrés décimaux), e) localisation sur le littoral et le type de côte, f) type de site comme référence ou gradient de pollution comme distance d'un site pollué (km), g) données environnementales telles que la température de l'eau (C°), la salinité (sans dimension) et l'oxygène dissous ($\mu\text{mol L}^{-1}$) ; si possible, les données relatives à la concentration de la Chla dans l'eau peuvent également être évaluées. Si nécessaire, les valeurs de la marée (m) doivent également être indiquées. Toutes les informations doivent se rapporter au jour de l'échantillonnage.

18. Pour les moules en cage, il est nécessaire d'inclure des informations sur la profondeur du déploiement (m), le temps d'immersion (jours), la profondeur de la colonne d'eau (m) et la source des moules.

19. Pour l'interprétation des effets biologiques des contaminants chimiques, il est important non seulement d'évaluer leurs concentrations dans les matrices environnementales, mais aussi d'estimer la quantité de contaminants prioritaires accumulés dans les tissus des mollusques. À cet égard, il est recommandé de surveiller les mêmes contaminants prioritaires pour l'IC 18 que ceux qui ont été approuvés pour la surveillance de l'IC 17 dans la matrice du biote, respectivement le Cd, le HgT, le Pb, les HAP, les PCB, l'hexachlorobenzène, le lindane et les ΣDDT ¹⁶. Dans ce dernier cas, 50 moules supplémentaires doivent être collectées pour l'analyse chimique, transportées au laboratoire, et maintenues au champ T, dans de l'eau de mer propre et aérée (au moins 1 l/animal) pendant 24 h pour éliminer le contenu des intestins. Ensuite, les tissus mous doivent être traités comme décrit dans les protocoles relatifs aux différentes analyses chimiques rapportées dans les Directives pour la préparation et l'analyse des échantillons de biote marin pour l'analyse du CI17 : éléments lourds et traces et contaminants organiques.¹⁷ À cet égard, il convient de noter que des analyses chimiques supplémentaires ne sont pas nécessaires, mais que l'approche intégrative utilise les données obtenues au cours des activités de surveillance chimique.

b. Transport des moules

20. Après la collecte, les animaux peuvent être utilisés pour la préparation des échantillons directement sur le terrain ; par conséquent, un espace propre et des installations de laboratoire sont nécessaires ; toutefois, la procédure la plus courante consiste à les transporter au laboratoire. Dans ce cas, les animaux sont transportés dans un sac à isolation thermique contenant quelques glaçons, les mollusques eux-mêmes étant enveloppés dans un tissu de coton imbibé d'eau de mer ; cela permet de maintenir la température du conteneur autour de 0-4 °C avec un taux d'humidité élevé. ~~However, the transport period should be no longer than 8 hrs.~~ Le transport doit être effectué dans un délai de 8 heures ; toutefois, il convient de noter que dans certains cas, le transport ne peut être effectué dans ce délai. Dans ce cas, le laboratoire doit recueillir des données préliminaires montrant qu'aucun changement ne se produit chez les animaux témoins maintenus pendant la période choisie dans les conditions de transport.

21. Au laboratoire, le Rapport de collecte doit être placé dans le Registre d'analyse des biomarqueurs ; les animaux doivent être immédiatement échantillonnés par le(s) chercheur(s) en charge du programme de biosurveillance et les échantillons doivent être correctement codés. Dans le

¹⁶ UNEP/MAP (2019). UNEP/MED WG.467/5. IMAP Guidance Fact Sheets: Update for Common Indicators 13, 14, 18, 18, 20 and 21: Nes proposal for Candidate Indicators 26 and 27.

¹⁷ Il convient de noter que, dans certains cas, les problèmes logistiques et les effets physiologiques sur les animaux peuvent être causés par le maintien des moules pendant 24 heures dans de l'eau de mer propre et aérée afin d'éliminer le contenu des intestins.

Registre, les noms des chercheurs impliqués doivent être indiqués ainsi que toutes les informations concernant l'emplacement du réfrigérateur dans lequel les échantillons sont stockés.

22. Enfin, il est également important de tenir compte du fait que dans le sud-est du bassin méditerranéen, il existe des zones côtières où *Mytilus* sp. n'est pas présente. Dans ces zones, l'utilisation des palourdes *Paratapes textilis* ou *Pinctada radiata* est recommandée. Ces mollusques bivalves sont des organismes benthiques qui vivent dans le sable. Par conséquent, ils fourniront des informations largement similaires à celles que l'on obtiendrait avec des moules sur les effets des contaminants présents dans la matière organique en suspension (la composante la plus importante du régime alimentaire de ces mollusques filtreurs) et ceux libérés par les sédiments dans l'eau interstitielle. Bien que ce ne soit pas exactement la même chose que les informations obtenues avec les moules (c'est-à-dire les organismes intertidaux exposés aux contaminants présents dans la colonne d'eau), l'analyse des biomarqueurs dans ces organismes permettra également de mesurer les effets biologiques nocifs des mélanges complexes de contaminants présents dans l'environnement marin côtier.

23. **In this way**, Les évaluations chimiques et biologiques intégrées des effets des contaminants présents dans l'environnement marin appuient la fourniture des données nécessaires à l'évaluation du BEE. En ce qui concerne la surveillance chimique, la collecte d'échantillons pour les biomarqueurs doit se concentrer sur des endroits sélectionnés tels que les points chauds et les sites de contrôle ou de référence.

2.2 Protocole pour la dissection et la conservation des échantillons de tissus de mollusques marins (tels que *Mytilus* sp.)

a. Matériel

24. L'application de ce protocole nécessite la disponibilité du matériel suivant : lames et manches de scalpel ; pinces à dissection, fines et moyennes ; ciseaux de dissection fins ; seringues de 1 ml ; seringues de 20 ml avec aiguille 21G (40 mm) ; filtres de seringue 0,45 µm ; tubes à centrifuger de 15 ml, polypropylène, stériles, fond conique ; tubes à microcentrifuger, bouchon à pression, 2,0 ml ; pipette à volume réglable, 20-200 µl et 200-1000 µl ; embouts de pipette, 20-200 µl et 200-1000 µl ; bécher en verre de 2 l ; glace et seau à glace ; packs de glace thermos ; mandrins de cryostat ; feuille d'aluminium/Parafilm ; récipient en plastique (200-400 ml) ; Récipient thermostatique en plastique (3-4 l) ; ruban d'étiquetage ; marqueur indélébile ; feuilles de papier et stylo.

b. Équipement

25. L'équipement suivant est nécessaire : pH-mètre ; agitateur magnétique ; pompe à air et barboteur pour aquarium ; récipient de stockage d'azote liquide (Dewar) ; congélateurs -80 °C ; Règle ; balance de pesée (lisibilité 0,1 g - 0,01 g).

c. Solutions et produits chimiques

26. Il est recommandé d'utiliser de l'eau de mer filtrée (0,45 µm) recueillie sur les sites d'échantillonnage des animaux ; il est également possible d'utiliser une solution saline physiologique dont la salinité et le pH sont identiques à ceux des sites d'échantillonnage. La salinité de la solution décrite ci-dessous est d'environ 30,5 PSU, cependant, dans la mer Méditerranée, la salinité peut atteindre jusqu'à 44 PSU.¹⁸

27. Les produits chimiques et la solution¹⁹ nécessaires à l'application de ce protocole sont les suivants : Solution saline physiologique : 20 mM (4,7 g) HEPES ; 436 mM (25,48 g) NaCl ; 53 mM (13,06 g) MgSO₄ ; 10 mM (0,75 g) KCl ; 10 mM (1,47 g) CaCl₂. La concentration de NaCl doit être ajustée pour tenir compte de la salinité de l'eau de mer sur le site d'échantillonnage. Ces composants doivent être dissous dans 1 litre d'eau déminéralisée (en utilisant un bécher en verre de 2 l et un agitateur magnétique). Il faut ensuite faire buller la solution pendant 10 minutes, puis l'ajuster à un pH

¹⁸Conformément à l'expérience actuelle de l'Espagne, l'utilisation alternative d'eau de mer filtrée, collectée sur les sites propres/de référence dans les eaux côtières nationales, à la salinité trouvée sur le site d'échantillonnage, peut être envisagée.

¹⁹ Si cela n'est pas spécifié, les réactifs doivent être de qualité analytique

de 7,9 (ou au pH de l'eau de mer du site d'échantillonnage) avec 1M NaOH. Il est nécessaire de conserver la solution dans un réfrigérateur, mais de l'utiliser à température ambiante.

28. De plus, de l'azote liquide et du n-Hexane sont nécessaires comme réactifs.

d. Dissection des tissus

29. Comme mentionné ci-dessus, la conservation, le stockage et le transport vers le laboratoire à partir de lieux éloignés sont des facteurs clés pour entreprendre des mesures toxicologiques sur des organismes vivants.

30. Les mollusques (si possible *Mytilus* sp.) sont ouverts en insérant un scalpel à mi-chemin de leur surface ventrale ; les tissus sont retirés à l'aide de ciseaux fins et de pinces à disséquer et tissus sont utilisés pour l'analyse des biomarqueurs. Lorsque cela est possible, cette dissection rapide doit être effectuée dès que possible peu de temps après l'échantillonnage des mollusques (cela doit être fait à bord dans un état propre).

31. Les branchies pour l'évaluation de l'activité AChE peuvent être utilisées comme tissu frais ou être rapidement congelées dans l'azote liquide et stockées à -80 °C jusqu'au moment de l'analyse (Bocquené et Galgani, F. 1998²⁰ ; PNUE/RAMOGÉ, 1999) ; les branchies pour l'évaluation de la fréquence MNi sont enlevées, placées dans des tubes à centrifuger de 15 ml et immédiatement traitées (PNUE/RAMOGÉ, 1999 ; Barsiene *et al.*, 2006²¹ ; Bolognesi et Fenech, 2012²²).

32. Les cellules hémolymphes pour l'évaluation de la LMS (test NRRT – Lowe *et al.*, 1995²³ ; PNUE/RAMOGÉ, 1999 ; Moore *et al.*, 2004 ; Martínez-Gómez *et al.*, 2015) sont préparées selon la procédure analytique suivante : une moitié de scalpel est insérée le long de la surface ventrale de la moule et les valves sont partiellement ouvertes ; un embout de pipette (1000 µl) est inséré pour permettre l'insertion de la seringue à insuline dans le muscle adducteur postérieur de la moule (Fig. 1A). *N.B.* il faut enlever l'aiguille de la seringue de 1 ml : la seringue doit être équipée d'une aiguille de 21 G (0,5 mm de diamètre intérieur), 40 mm (aiguille d'une seringue de 20 ml). L'eau est évacuée des coquilles. La seringue est remplie de 0,5 ml de solution saline physiologique, puis 0,5 ml d'hémolymphes sont aspirés du muscle adducteur postérieur de la moule. Après avoir obtenu l'échantillon d'hémolymphes, l'aiguille est déchargée, et le contenu est expulsé dans un tube de microcentrifugation de 2 ml.

33. Les cellules hémolymphes pour l'évaluation de la fréquence des MNi sont obtenues comme décrit ci-dessus pour la LMS (PNUE/RAMOGÉ, 1999 ; Bolognesi et Fenech, 2012).

34. Les glandes digestives pour l'évaluation de la LMS (analyse cytochimique sur des sections de cryostat – Moore, 1976²⁴, PNUE/RAMOGÉ, 1999 ; Moore *et al.*, 2004 ; Martínez-Gómez *et al.*, 2015) sont obtenues suivant cette procédure : cinq petits morceaux de glande digestive (4-5 mm³) sont rapidement excisés de la partie médiane de l'organe obtenu de cinq animaux différents et placés sur un mandrin de cryostat en aluminium (alignés en ligne droite au centre). Le mandrin doit être pré-étiqueté et pré-refroidi dans de la glace. Dix animaux seront analysés en préparant deux mandrins pour le même échantillon de terrain. Pendant la dissection du tissu, le mandrin doit être laissé sur la glace. Ensuite, le mandrin est placé pendant 40 secondes dans une petite boîte en plastique (200-400 ml) contenant du n-hexane pré-refroidi (le sur-refroidissement de l'hexane empêche la formation de glace dans les tissus et, par conséquent, il réduit les dommages structuraux aux composants subcellulaires) à -70 °C en utilisant de l'azote liquide rempli dans un récipient thermostatique en plastique (3-4 l) (la température d'environ -70 °C est visualisée par la solidification du n-hexane, une certaine quantité de n-hexane liquide en présence d'un composant solide assurera la température correcte pour le traitement de l'échantillon). Le mandrin est scellé avec 2 à 3 pièces de Parafilm/feuilles d'aluminium et

²⁰ Bocquené, G., Galgani, F. 1998. Biological effects of contaminants: Cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds. ICES Techniques in Marine Environmental Sciences, No. 22

²¹ Barsiene, J., Schiedek, D., Rybakovas, A., Syvokiene, J., Kopecka, J., Forlin, L., 2006. Cytogenetic and cytotoxic effects in gill cells of the blue mussel *Mytilus* spp. from different zones of the Baltic Sea. Mar. Pollut. Bull. 53, 469-478

²² Bolognesi, C., Fenech, M., 2012. Mussel micronucleus cytome assay, Nat. Protoc. 17, 1125-1137.

²³ Lowe, D.M., Soverchia C., Moore M.N., 1995. Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. Aquatic Toxicol. 33, 105-112.

²⁴ Moore, M.N., 1976. Cytochemical demonstration of latency of lysosomal hydrolases in digestive gland cells of the common mussel *Mytilus edulis*, and changes induced by thermal stress. Cell Tissue Res. 175, 279-287.

immédiatement stocké à -70 °C (à cette température, les préparations de tissus conservent leur intégrité pendant des mois).

e. Paramètres supplémentaires à enregistrer lors de cette étape (sur le terrain ou au laboratoire)

35. Les paramètres supplémentaires suivants doivent être enregistrés lors de cette étape, sur le terrain ou au laboratoire :

- Biométrie des moules : longueur (à 0,1 cm), poids (à 0,1 g), poids des tissus mous (à 0,1 g) ; masse des tissus mous secs / masse de la coquille sèche;
- Indice de condition (CInd) : ce paramètre doit être évalué de manière simple comme suit : $CInd = 100 \times \text{Poids sec (à 0,01 g)} / \text{Poids de l'animal entier (à 0,1 g)}$; alternativement, masse de tissus mous secs / masse de coquille sèche. Des approches plus précises (et complexes) sont disponibles telles que : $CInd = 100 \times \text{Poids sec} / \text{Volume de coque interne}$ (ICES, 2011 ; Lutz, 1980 ; Aldrich et Crowley ; 1986 ; Davenport et Chen, 1987 ; Hansson et al., 2017) (CIEM, 2011 ; Lutz, 1980²⁵ ; Aldrich et Crowley ; 1986²⁶ ; Davenport et Chen, 1987²⁷ ; Hansson *et al.*, 2017).

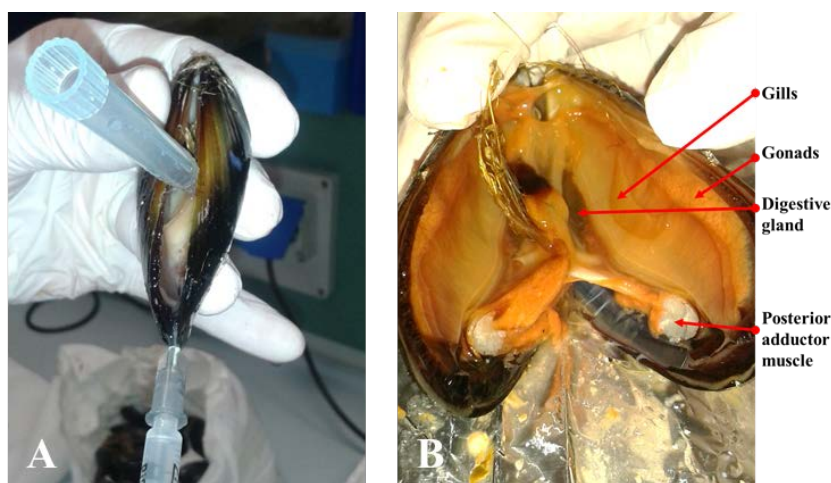


Fig. 1. A) Extraction de l'hémolymphe du muscle adducteur postérieur de la moule ; B) Identification des tissus de la moule.

36. La présence de parasites dans les tissus mous doit également être signalée (Francisco, C. J et al. 2010²⁸, Robledo, J. A. F et al. 1994²⁹, Figueras, A. J et al. 1991³⁰).

37. Les mollusques échantillonnés et leurs gonades doivent être enregistrés par une caméra vidéo haute définition (ou une caméra vidéo de smartphone) afin de documenter le statut reproductif des animaux. Les échantillons de gonades doivent être congelés dans l'azote liquide et conservés à -70 °C afin d'être disponibles, si nécessaire, pour un examen.

38. À la fin de la procédure relative à la préparation et au stockage des échantillons, un rapport doit être préparé indiquant la liste et le code des échantillons pour les différentes analyses de biomarqueurs, le réfrigérateur à -80 °C utilisé pour le stockage des échantillons et l'emplacement dans le réfrigérateur des différents échantillons, ainsi que la liste rapportant les données relatives à tous les

²⁵ Lutz, R.A. 1980. Mussel Culture and Harvest: A North American Perspective, Elsevier Science Publishers, B.V. Amsterdam, 305pp.

²⁶ Aldrich, J.C., Crowley, M. 1986. Conditions and variability in *Mytilus edulis* L. from different habitats in Ireland. Aquaculture 52: 273–286.

²⁷ Davenport, J., Chen, X. 1987. A comparison of methods for the assessment of condition in the mussel (*Mytilus edulis* L.). J. Molluscan Stud., 53: 293–297.

²⁸ Francisco, C. J., Hermida, M. A., & Santos, M. J. (2010). Parasites and symbionts from *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) (Bivalves: Mytilidae) of the Aveiro estuary Portugal. Journal of Parasitology, 96(1), 200-205

²⁹ Robledo, J. A. F., Santarém, M. M., & Figueras, A. (1994). Parasite loads of rafted blue mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in Spain with special reference to the copepod, *Mytilicola intestinalis*. Aquaculture, 127(4), 287-302

³⁰ Figueras, A. J., Jardon, C. F., & Caldas, J. R. (1991). Diseases and parasites of rafted mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk): preliminary results. Aquaculture, 99(1-2), 17-33

paramètres supplémentaires évalués. Le rapport doit être ajouté au Registre pour l'analyse des biomarqueurs. Dans le Rapport, il faut également indiquer les données de préparation et de stockage des échantillons et le nom des chercheurs impliqués dans le travail.

3 Note technique pour l'échantillonnage et la conservation des poissons marins (*Mullus barbatus*) pour l'analyse des biomarqueurs

39. L'objectif du Programme de biosurveillance MED POL est de fournir une image claire de la qualité du milieu marin et du littoral dans la zone méditerranéenne. Un aspect important pour atteindre cet objectif est la sélection des organismes sentinelles à utiliser pour l'évaluation des effets toxiques des contaminants marins.

40. L'utilisation des mêmes organismes dans les différentes zones méditerranéennes garantit des résultats écotoxicologiques plus comparables. Le *Mullus barbatus* a été sélectionné comme organisme sentinelle sur la base des résultats de nombreuses études et des activités précédentes dans le cadre des programmes de biosurveillance du MED POL (PNUE/RAMOG, 1999).

41. Les poissons marins *M. barbatus* utilisés pour effectuer les évaluations toxicologiques des biomarqueurs doivent également être utilisés pour l'analyse chimique, comme décrit dans les Lignes directrices/Protocoles de surveillance pour l'échantillonnage et la préservation des échantillons de biote marin pour l'indicateur commun 17 de l'IMAP : éléments lourds et traces et contaminants organiques pour le CI 17 (PNUE/PAM WG.482/43 509/23). Les poissons échantillonnés doivent être vivants et en bonne condition. Dans la mesure du possible, il est recommandé, une fois le poisson à bord, de le maintenir en vie dans des bassins aérés en utilisant de l'eau de mer propre avant de procéder à la dissection des tissus.

42. Le rouget de vase, *Mullus barbatus* (L.), est un poisson largement répandu le long de toutes les côtes méditerranéennes (www.fao.org/fishery/species/3208/fr). Il a été utilisé ces dernières années comme organisme sentinelle pour évaluer l'accumulation de produits chimiques toxiques, ainsi que pour étudier les effets biologiques nocifs des polluants environnementaux (Mathieu *et al.*, 1991³¹ ; Porte *et al.*, 2002³² ; Regoli *et al.*, 2002³³ ; Viarengo *et al.*, 2007³⁴ ; Martínez-Gómez *et al.*, 2012³⁵, 2017³⁶). À cet égard, la différence de sexe est essentielle pour l'analyse des contaminants et ces analyses doivent, si possible, être effectuées sur des échantillons groupés du même sexe. Son mode de vie (c'est-à-dire animaux non migrateurs, relativement localisés dans les zones côtières) et ses habitudes alimentaires (par exemple, régime principalement composé de petits organismes benthiques tels que des crustacés, des mollusques et des vers) www.fao.org/fishery/species/3208/fr font de ce poisson un organisme sentinelle approprié. *Mullus barbatus* est un reproducteur discontinu ; l'existence d'un mouvement saisonnier lié à la profondeur chez cette espèce a été bien décrite (Machias et Labropoulou, 2002³⁷). Leur consommation de produits chimiques toxiques reflète bien le niveau de pollution des sédiments des plateaux continentaux intérieurs et moyens et de la colonne d'eau qui les recouvre.

³¹ Mathieu, A., Lemaire, P., Carriere, S., Draï, P., Giudicelli, J., Lafaurie, M., 1991. Seasonal and sex-linked variations in hepatic and extrahepatic biotransformation activities in striped mullet (*Mullus barbatus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 22, 45-57.

³² Porte, C., Escartín, E., García de la Parra, L.M., Biosca, X., Albaigés, J., 2002. Assessment of coastal pollution by combined determination of chemical and biochemical markers in *Mullus barbatus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 235, 205-216.

³³ Regoli, F., Pellegrini, D., Winston, G.W., Gorbí, S., Giuliani, S., Virno-Lamberti, C., Bompadre, S., 2002. Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). *Mar. Pollut. Bull.* 44, 912-922.

³⁴ Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol. C* 146, 281-300.

³⁵ Martínez-Gómez, C., Fernández, B., Benedicto, J., Valdés, J., Campillo, J. A., León, V. M., Vethaak, A. D., 2012. Health status of red mullets from polluted areas of the Spanish Mediterranean coast, with special reference to Portmán (SE Spain). *Mar. Environ. Res.* 77, 50-59. Martínez-Gómez, C., Fernández, B., Robinson, C. D., Campillo, J. A., León, V. M., Benedicto, J., ... & Vethaak, A. D. (2017). Assessing environmental quality status by integrating chemical and biological effect data: The Cartagena coastal zone 26as a case. *Marine environmental research*, 124, 106-117.

³⁷ Machias, A., Labropoulou, M., 2002. Intra-specific variation in resource use by red mullet, *Mullus barbatus*. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 55, 565-578.

43. Dans le cadre de cette note technique, les Lignes directrices pour la surveillance de l'échantillonnage et de la conservation des échantillons de mollusques marins (tels que *Mytilus* sp.) et de poissons (*Mullus barbatus*) pour l'indicateur commun 18 de l'IMAP fournissent les deux protocoles suivants : i) Protocole pour la collecte des poissons marins (*Mullus barbatus*) et ii) Protocole pour la dissection et le stockage des échantillons de tissus de poissons marins (*Mullus barbatus*)

3.1 Protocole pour la collecte de poissons marins (*Mullus barbatus*)

a. Sélection des zones d'échantillonnage et fréquence d'échantillonnage

44. *M. barbatus* est une espèce benthique qui habite les fonds sableux et vaseux du plateau continental méditerranéen (www.fao.org/fishery/species/3208/fr). Les organismes matures sont généralement distribués dans les 3 à 5 premiers kilomètres de la côte à des profondeurs allant de quelques mètres à 500 mètres (Carlucci *et al.*, 2009³⁸ ; Follesa et Carbonara, 2019³⁹).

45. Bien que la différence de sexe puisse influencer divers paramètres physiologiques, les biomarqueurs sélectionnés pour l'évaluation environnementale peuvent être évalués en utilisant des poissons mâles et femelles, à condition que les spécimens utilisés soient échantillonnés selon un protocole d'échantillonnage standardisé afin de minimiser les facteurs de confusion. Toutefois, les animaux doivent toujours être échantillonnés en dehors des périodes de reproduction (c'est-à-dire en septembre-octobre ou en mars-avril – voir les lignes directrices pour l'analyse des biomarqueurs CI 18) (Carbonara *et al.*, 2015⁴⁰ ; Ferrer-Maza *et al.*, 2015⁴¹).

b. Collecte de poissons

46. *M. barbatus* est collecté par pêche au filet maillant ou au chalut à l'aide d'un filet à mailles carrées de 40 mm ou, si cela est justifié, d'un filet à mailles losanges de 50 mm, conformément à la législation européenne (CE 1967/2006⁴² ; Sieli *et al.*, 2011⁴³). La durée de la pêche au filet maillant ne doit pas dépasser 30 minutes et la durée de la pêche au chalut 15 minutes, à une vitesse inférieure ou égale à 3 nœuds, afin de réduire au minimum les altérations possibles de l'état physiologique des poissons vivants. Les poissons ayant une longueur de 12-16 cm doivent être sélectionnés pour l'analyse des biomarqueurs.

47. Les poissons sont tués à bord et les tissus destinés à l'analyse des biomarqueurs sont prélevés comme décrit dans le Protocole pour la dissection et le stockage des échantillons de tissus de poissons marins (*Mullus barbatus*).

48. Pour l'interprétation des effets biologiques des contaminants chimiques, il est important non seulement d'évaluer leurs concentrations dans les matrices environnementales, mais aussi d'estimer la quantité de contaminants prioritaires dans les tissus ou le corps des poissons. À cet égard, il est recommandé de surveiller les mêmes contaminants prioritaires pour l'IC 18 que ceux qui ont été approuvés pour la surveillance de l'IC 17 dans la matrice du biote, respectivement le Cd, le HgT, le Pb, les HAP, les PCB, l'hexachlorobenzène, le lindane et les ΣDDT⁴⁴. Dans ce dernier cas, les

³⁸ Carlucci, R., Lembo, G., Maiorano, P., Capezzuto, F., Marano, C.A., Sion, L., Spedicato, M.T., Ungaro, N., Tursi, A., Gianfranco, D., 2009. Nursery areas of red mullet (*Mullus barbatus*), hake (*Merluccius merluccius*) and deep-water rose shrimp (*Parapenaeus longirostris*) in the Eastern-Central Mediterranean Sea. Estuar. Coast. Shelf Sci. 83, 529-538

³⁹ Follesa, M.C., Carbonara, P., eds. 2019. Atlas of the maturity stages of Mediterranean fishery resources. Studies and Reviews n. 99. Rome, FAO. 268 pp.

⁴⁰ Carbonara, P., Intini, S., Modugno, E., Maradonna, F., Spedicato, M. T., Lembo, G., Zupa, W., Carnevali, O., 2015. Reproductive biology characteristics of red mullet (*Mullus barbatus* L., 1758) in Southern Adriatic Sea and management implications. Aquat. Living Resour. 28, 21-31.

⁴¹ Ferrer-Maza, D., Muñoz, M., Lloret, J., Faliex, E., Vila, S., Sasal, P., 2015. Health and reproduction of red mullet, *Mullus barbatus*, in the western Mediterranean Sea. Hydrobiologia 753, 189-204.

⁴² EC COUNCIL REGULATION No 1967/2006 of 21 December 2006 concerning management measures for the sustainable exploitation of fishery resources in the Mediterranean Sea, amending Regulation (EEC) No 2847/93 and repealing Regulation (EC) No 1626/94

⁴³ Sieli, G., Badalucco, C., Di Stefano, G., Rizzo, P., D'Anna, G., Fiorentino, F. 2011. Biology of red mullet, *Mullus barbatus* (L. 1758), in the Gulf of Castellammare (NW Sicily, Mediterranean Sea) subject to a trawling ban. J Appl Ichthyol. 27:1218-1225.

⁴⁴ UNEP/MAP (2019). UNEP/MED WG.467/5. IMAP Guidance Factsheets: Update for Common Indicators 13, 14, 17, 18, 20 and 21: New proposal for Candidate indicators 26 and 27.

poissons doivent être collectés, transportés au laboratoire et traités comme décrit dans les protocoles relatifs aux différentes analyses chimiques pour le CI 17, comme indiqué dans les Directives pour la préparation des échantillons et l'analyse du biote marin pour l'analyse du CI 17 : éléments lourds et traces et contaminants organiques.

49. ~~In this way~~, Les évaluations chimiques-biologiques intégrées des effets des contaminants présents dans le milieu marin appuient la fourniture de données pour l'évaluation du BEE. En ce qui concerne la surveillance chimique, la collecte d'échantillons doit être concentrée sur des endroits sélectionnés tels que les points chauds et les stations de référence. Dans la mesure du possible, le même spécimen doit être utilisé pour l'analyse des biomarqueurs et l'analyse chimique. Toutefois, il faut également tenir compte du fait que l'équipe de recherche chargée de l'échantillonnage pour l'analyse chimique n'est généralement pas la même que celle qui est chargée de l'échantillonnage pour l'analyse des biomarqueurs.

50. Au cours de la collecte des poissons, un rapport (Rapport de collecte) doit être préparé. Il doit contenir des informations sur l'échantillonnage relatives a) aux données d'échantillonnage (jour, mois et année), b) au nombre de poissons échantillonnés, c) à la profondeur de collecte (m), d) au géoréférencement (latitude et longitude, degrés décimaux), e) au type de fond, f) au type de site comme référence ou au gradient de pollution comme distance d'un site pollué (km), g) aux données environnementales telles que la température de l'eau (C°), la salinité (sans dimension) et l'oxygène dissous ($\mu\text{mol L}^{-1}$). Il est à noter que les données environnementales (température de l'eau, salinité et oxygène dissous) doivent être enregistrées à la même profondeur que celle à laquelle les poissons ont été collectés. Dans la mesure du possible, l'utilisation d'un instrument de mesure de la conductivité, de la température et de la profondeur (CTP) est fortement recommandée.

51. Au laboratoire, le Rapport de collecte doit être laissé dans le Registre d'analyse des biomarqueurs ; le Rapport doit également contenir les noms des chercheurs impliqués dans la collecte des poissons.

3.2 Protocole pour la dissection et la conservation des échantillons de tissus de poissons marins (*Mullus barbatus*)

a. Matériel

52. L'application de ce protocole nécessite la disponibilité du matériel suivant : pince à dissection, fine et moyenne ; ciseaux à dissection robustes et fins ; seringue à usage unique, 5 ml ; pipette à volume réglable, 20-200 μl et 200-1000 μl ; embouts de pipette, 20-200 μl et 200-1000 μl ; lames de microscope, 76x26 mm, 1 mm d'épaisseur, pré-nettoyées/prêtes à l'emploi, Menzel-Gläser, Superfrost, essuyées avec de l'éthanol et mises à sécher avant utilisation ; glace et seau à glace ; packs de glace thermos ; mandrins de cryostat (support en aluminium anodisé pour couper les sections de cryostat des échantillons biologiques) ; feuille d'aluminium/Parafilm ; récipient thermostatique en plastique (200-400 ml) ; ruban d'étiquetage ; marqueur indélébile ; feuilles de papier et stylo.

b. Équipement

53. L'équipement suivant est nécessaire : cConteneur de stockage d'azote liquide (Dewar) ; congélateurs -80 °C ; règle ; balance de pesée (lisibilité 0,1 g - 0,01 g) ; caméra vidéo/Caméra vidéo Smartphone.

c. Produits chimiques et solutions

54. Les produits chimiques et la solution nécessaires à l'application de ce protocole sont les suivants : Héparine de sodium ; méthanol, alcool méthylique, absolu, essai : 99,8 % ; éthanol ; azote liquide.

N.B. Si cela n'est pas spécifié, les réactifs doivent être de qualité analytique.

d. Dissection des tissus

55. Immédiatement après la collecte, les poissons vivants (*Mullus barbatus*) sont tués à bord en sectionnant la moelle épinière et rapidement disséqués afin d'obtenir les tissus pour l'analyse des biomarqueurs sélectionnés. Pour réussir à obtenir des cellules sanguines à partir de la veine caudale, il est recommandé de les extraire immédiatement après la collecte, une fois que les poissons sont à bord, avant que tout autre prélèvement de tissus ait été effectué et avant que le sang ne commence à coaguler.

56. Les poissons sont ouverts à l'aide de ciseaux robustes et les tissus sont retirés à l'aide de ciseaux fins de dissection et de pinces de dissection.

57. Les échantillons de foie destinés à l'évaluation de la stabilité de la membrane lysosomale (test cytochimique de la LMS sur des sections de cryostat – Köhler, 1991⁴⁵ ; Köhler et Pluta, 1995⁴⁶ ; PNUE/RAMOG, 1999 ; Martínez-Gómez *et al.*, 2015) sont traités essentiellement comme décrit pour les glandes digestives des moules (Protocole pour la dissection et le stockage des échantillons de tissus de mollusques marins [tels que *Mytilus* sp.]).

58. La seule différence est que les mandrins sont congelés directement dans l'azote liquide pendant 40 s. Excisez rapidement cinq petits morceaux (4 à 5 mm³) de la partie médiane de l'organe obtenu de cinq animaux différents et placez-les sur un mandrin de cryostat en aluminium (alignés en ligne droite au centre). Le mandrin doit être pré-étiqueté et pré-refroidi dans de la glace. Dix animaux seront analysés en préparant deux mandrins pour le même échantillon de terrain. Pendant la dissection du tissu, laissez le mandrin sur la glace. Ensuite, placez-le pendant 40 s dans une petite boîte en plastique thermostatique contenant de l'azote liquide. Scellez le mandrin avec 2 à 3 pièces de Parafilm/feuille d'aluminium et stockez-le immédiatement à -70 °C (à cette température, les préparations de tissus conservent leur intégrité pendant des mois). La LMS est un paramètre très sensible : une attention particulière doit être accordée à l'utilisation de poissons subissant un stress minimal pendant la pêche.

59. Le muscle destiné à l'évaluation de l'activité de l'AChE peut être utilisé comme tissu frais ou être rapidement congelé dans l'azote liquide et stocké à -70 °C avant l'analyse (à cette température, les préparations tissulaires conservent leur intégrité pendant des mois). Le tissu cérébral du *Mullus barbatus* peut être considéré comme un tissu supplémentaire pour l'évaluation de l'activité de l'AChE, mais pas comme une alternative à l'évaluation de l'activité de l'AChE dans le muscle. Toutefois, il convient de noter que les études préliminaires et la littérature scientifique disponible confirment une activité élevée dans le tissu cérébral du *Mullus barbatus*.

60. Immédiatement après l'échantillonnage du poisson, les cellules sanguines pour l'évaluation de la fréquence des micronoyaux sont prélevées dans la veine caudale de poissons intacts à l'aide d'une seringue contenant de l'héparine de sodium (1000 unités/ml), mélangées et immédiatement étalées sur des lames de verre propres (Bolognesi et Hayashi, 2011⁴⁷). Les lames sont séchées pendant une nuit et ensuite fixées avec du méthanol pendant au moins 20 minutes.

e. Paramètres supplémentaires à enregistrer lors de cette étape (sur le terrain ou au laboratoire)

61. Les paramètres supplémentaires suivants doivent être enregistrés lors de cette étape, sur le terrain ou au laboratoire :

- Biométrie des poissons : longueur totale (à 0,1 cm près), poids (à 0,1 g près), poids éviscéré (jusqu'à 0,1 g);

⁴⁵ Köhler, A., 1991. Lysosomal perturbations in fish liver as indicators for toxic effects of environmental pollution. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C, 123-127.

⁴⁶ Köhler, A. Pluta, H.J., 1995. Lysosomal injury and MFO activity in the liver of flounder (*Platichthys flesus* L.) in relation to histopathology of hepatic degeneration and carcinogenesis. *Mar. Environ. Res.* 39, 255-260.

⁴⁷ Bolognesi, C., Hayashi, M., 2011. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis* 26, 205-213.

- Le facteur de condition de Fulton, K (Bagenal et Tesch, 1978⁴⁸). $K = 100 \text{ poids (à } 0,1 \text{ g) / longueur totale (à } 0,1 \text{ cm}^3)$. Le facteur de condition reflète l'état nutritionnel ou le « bien-être » d'un poisson individuel et est parfois interprété comme un indice du taux de croissance (Bagenal et Tesch, 1978 ; CIEM, 2011) ;
- Mesure du GSI : $GSI = (\text{poids des gonades [jusqu'à } 0,01 \text{ g}] \times 100) / (\text{poids total du corps [jusqu'à } 0,1 \text{ g]} - \text{contenu de l'estomac} - \text{poids des gonades [jusqu'à } 0,01 \text{ g}])$. La taille des gonades est un indicateur important du statut reproductif et le GSI permet d'évaluer si les poissons, par rapport à leur taille (ou leur âge), sont sexuellement immatures ou adultes, ou si les animaux présentent un retard de développement des gonades par rapport au développement sexuel normal (Hansson *et al.*, 2017 ; CIEM, 2011) ;
- Index somatique du foie (LSI ou HSI). $LSI = (\text{poids du foie [jusqu'à } 0,1 \text{ g}] \times 100) / (\text{poids corporel total [jusqu'à } 0,1 \text{ g]} - \text{contenu de l'estomac} - \text{poids du foie [jusqu'à } 0,1 \text{ g}])$. Comme on le sait, le foie joue un rôle central dans le métabolisme des poissons et de nombreuses études ont mis en évidence que les produits chimiques toxiques peuvent affecter la taille du foie et ses fonctions. Il a également été démontré dans de nombreuses études de terrain que l'accumulation de contaminants dans le poisson peut affecter la valeur de l'ISL (Hansson *et al.*, 2017 ; CIEM, 2011).
- Âge : Une longueur de 12 à 16 cm est une dimension typique des poissons âgés de 1 à 2 ans (Carbonara *et al.* 2018⁴⁹). Pour établir l'âge du *M. barbatus* de manière plus précise, il est nécessaire d'évaluer les otolithes comme décrit par le CIEM (2017⁵⁰) et Carbonara *et al.* (2018).

62. Les poissons échantillonnés et leurs gonades doivent être enregistrés par une caméra vidéo haute définition (ou une caméra vidéo de smartphone) afin de documenter le statut reproductif des animaux. Les échantillons de gonades doivent être congelés dans l'azote liquide et conservés à -70 °C afin d'être disponibles, si nécessaire, pour un examen.

63. À la fin de la procédure relative à la préparation et au stockage des échantillons, un rapport doit être préparé. Il doit contenir la liste et le code des échantillons pour les différentes analyses de biomarqueurs, le réfrigérateur à -80 °C utilisé pour le stockage des échantillons et l'exact emplacement dans le réfrigérateur des différents échantillons, ainsi que la liste rapportant les données relatives à tous les paramètres supplémentaires évalués. Le rapport doit être ajouté au Registre pour l'analyse des biomarqueurs. Le Rapport doit également inclure les données de préparation et de stockage des échantillons et le nom des chercheurs impliqués dans le travail.

⁴⁸ Bagenal, T.B. and Tesch, F.W. 1978. Age and Growth. Pages 101-136, in T.B. Bagenal, edit. Methods for assessment of fish production in freshwaters, 3rd edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England.

⁴⁹ Carbonara P., Intini S., Kolitari J., et al. 2018. A holistic approach to the age validation of *Mullus barbatus* L., 1758 in the Southern Adriatic Sea (Central Mediterranean). Sci. Rep. 8: 13219.

⁵⁰ ICES, 2017. Workshop on Ageing Validation methodology of *Mullus* species (WKVALMU), 15-19 May 2017, Conversano, Italy. ICES CM 2017/ SSGEOM:31. 74 pp.

Annexe I
Références

Aldrich, J.C., Crowly, M. 1986. Conditions and variability in *Mytilus edulis* L. from different habitats in Ireland. *Aquaculture* 52: 273–286.

Bagenal, T.B. and Tesch, F.W. 1978. Age and Growth. Pages 101-136, in T.B. Bagenal, edit. *Methods for assessment of fish production in freshwaters*, 3rd edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England.

Barsiene, J., Schiedek, D., Rybakovas, A., Syvokiene, J., Kopecka, J., Forlin, L., 2006. Cytogenetic and cytotoxic effects in gill cells of the blue mussel *Mytilus* spp. from different zones of the Baltic Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 53, 469-478.

Bayne, B.L., 2009. *Marine Mussels: Their Ecology and Physiology*. Cambridge University Press 528 p.

Bocquené, G., Galgani, F. 1998. Biological effects of contaminants: Cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*, No. 22.

Bolognesi, C., Fenech, M., 2012. Mussel micronucleus cytome assay, *Nat. Protoc.* 17, 1125-1137.

Bolognesi, C., Hayashi, M., 2011. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis* 26, 205-213.

Braby, C.E., Somero, G.N., 2006. Following the heart: temperature and salinity effects on heart rate in native and invasive species of blue mussels (genus *Mytilus*). *J. Exp. Biol.* 209, 2554-2566.

Carbonara P., Intini S., Kolutari J., et al. 2018. A holistic approach to the age validation of *Mullus barbatus* L., 1758 in the Southern Adriatic Sea (Central Mediterranean). *Sci. Rep.* 8: 13219.

Carbonara, P., Intini, S., Modugno, E., Maradonna, F., Spedicato, M. T., Lembo, G., Zupa, W., Carnevali, O., 2015. Reproductive biology characteristics of red mullet (*Mullus barbatus* L., 1758) in Southern Adriatic Sea and management implications. *Aquat. Living Resour.* 28, 21-31.

Carlucci, R., Lembo, G., Maiorano, P., Capezzuto, F., Marano, C.A., Sion, L., Spedicato, M.T., Ungaro, N., Tursi, A., Gianfranco, D., 2009. Nursery areas of red mullet (*Mullus barbatus*), hake (*Merluccius merluccius*) and deep-water rose shrimp (*Parapenaeus longirostris*) in the Eastern-Central Mediterranean Sea. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 83, 529-538.

Davenport, J., Chen, X. 1987. A comparison of methods for the assessment of condition in the mussel (*Mytilus edulis* L.). *J. Molluscan Stud.*, 53: 293–297.

EC COUNCIL REGULATION No 1967/2006 of 21 December 2006 concerning management measures for the sustainable exploitation of fishery resources in the Mediterranean Sea, amending Regulation (EEC) No 2847/93 and repealing Regulation (EC) No 1626/94.

Ferrer-Maza, D., Muñoz, M., Lloret, J., Faliex, E., Vila, S., Sasal, P., 2015. Health and reproduction of red mullet, *Mullus barbatus*, in the western Mediterranean Sea. *Hydrobiologia* 753, 189-204.

Follesa, M.C., Carbonara, P., eds. 2019. Atlas of the maturity stages of Mediterranean fishery resources. *Studies and Reviews n. 99*. Rome, FAO. 268 pp.

Goldberg, E.D., Bowen, V.T., Farrington, J.W., Harvey, G., Martin, J.H., Parker P.L., Risebrough, R.W., Robertson, W., Schneider, E., Gamble, E., 1978. The Mussel Watch. *Environmental Conservation* 5, 101-125.

Hansson, T., Thain, J., Martínez-Gómez, C., Hylland, K., Gubbins, M., Balk L., 2017. Supporting variables for biological effects measurements in fish and blue mussel. ICES Techniques in Marine Environmental Sciences. No. 60. 22 pp. <http://doi.org/10.17895/ices.pub.2903>.

ICES, 2011. Report of the Study Group on Integrated Monitoring of Contaminants and Biological Effects (SGIMC), 14–18 March 2011, Copenhagen, Denmark. ICES CM 2011/ACOM:30. 265 pp.

ICES, 2017. Workshop on Ageing Validation methodology of *Mullus* species (WKVALMU), 15-19 May 2017, Conversano, Italy. ICES CM 2017/ SSGIEOM:31. 74 pp.

Köhler, A., 1991. Lysosomal perturbations in fish liver as indicators for toxic effects of environmental pollution. Comp. Biochem. Physiol. 100C, 123-127.

Köhler, A. Pluta, H.J., 1995. Lysosomal injury and MFO activity in the liver of flounder (*Platichthys flesus* L.) in relation to histopathology of hepatic degeneration and carcinogenesis. Mar. Environ. Res. 39, 255-260.

Lowe, D.M., Soverchia C., Moore M.N., 1995. Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. Aquatic Toxicol. 33, 105-112.

Lutz, R.A. 1980. Mussel Culture and Harvest: A North American Perspective, Elsevier Science Publishers, B.V. Amsterdam, 305pp.

Machias, A., Labropoulou, M., 2002. Intra-specific variation in resource use by red mullet, *Mullus barbatus*. Estuar. Coast. Shelf Sci. 55, 565-578.

Martínez-Gómez, C., Bignell, J. and Lowe, D., 2015. Lysosomal membrane stability in mussels. ICES Techniques in Marine Environmental Sciences No. 56. 41 pp.

Martínez-Gómez, C., Fernández, B., Benedicto, J., Valdés, J., Campillo, J. A., León, V. M., Vethaak, A. D., 2012. Health status of red mullets from polluted areas of the Spanish Mediterranean coast, with special reference to Portmán (SE Spain). Mar. Environ. Res. 77, 50-59.

Martínez-Gómez, C., Fernández, B., Robinson, C. D., Campillo, J. A., León, V. M., Benedicto, J., & Vethaak, A. D. (2017). Assessing environmental quality status by integrating chemical and biological effect data: The Cartagena coastal zone as a case. Marine Environ. Res. 124, 106-117.

Mathieu, A., Lemaire, P., Carriere, S., Draï, P., Giudicelli, J., Lafaurie, M., 1991. Seasonal and sex-linked variations in hepatic and extrahepatic biotransformation activities in striped mullet (*Mullus barbatus*). Ecotoxicol. Environ. Saf. 22, 45-57.

Moore, M.N., 1976. Cytochemical demonstration of latency of lysosomal hydrolases in digestive gland cells of the common mussel *Mytilus edulis*, and changes induced by thermal stress. Cell Tissue Res. 175, 279-287.

Moore, M.N., Lowe, D. and Köhler, A. 2004. Biological effects of contaminants: Measurement of lysosomal membrane stability. ICES Techniques in Marine Environmental Sciences. No. 36. 39 pp.

OSPAR, 1997. JAMP Guidelines for General Biological Effects Monitoring (OSPAR Agreement 1997-7). OSPAR Commission, Monitoring guidelines. Ref. No: 1997-7. 20 pp.

Porte, C., Escartín, E., García de la Parra, L.M., Biosca, X., Albaigés, J., 2002. Assessment of coastal pollution by combined determination of chemical and biochemical markers in *Mullus barbatus*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 235, 205-216.

Regoli, F., Pellegrini, D., Winston, G.W., Gorbi, S., Giuliani, S., Virno-Lamberti, C., Bompadre, S., 2002. Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). Mar. Pollut. Bull. 44, 912-922.

Sforzini S, Oliveri C, Orrù A, Chessa G, Jha A, Viarengo A, Banni M., 2018. Application of a new targeted low density microarray and conventional biomarkers to evaluate the health status of marine mussels: A field study in Sardinian coast, Italy. Sci. Total Environ. 628-629, 319-328.

Sieli, G., Badalucco, C., Di Stefano, G., Rizzo, P., D'Anna, G., Fiorentino, F. 2011. Biology of red mullet, *Mullus barbatus* (L. 1758), in the Gulf of Castellammare (NW Sicily, Mediterranean Sea) subject to a trawling ban. J Appl Ichthyol. 27:1218-1225.

UNEP, 1997. The MED POL Biomonitoring Programme Concerning the Effects of Pollutants on Marine Organisms Along the Mediterranean Coasts. UNEP(OCA)/MED WG.132/3, Athens.

UNEP/RAMOG: Manual on the Biomarkers Recommended for the MED POL Biomonitoring Programme. UNEP, Athens, 1999.

UNEP/MAP (2019) UNEP/MED WG.467/5. IMAF Guidance Factsheets: Update for Common Indicators 13,14, 17, 18, 20 and 21: New proposal for candidate indicators 26 and 27.

Viarengo, A., Dondero, F., Pampanin, D.M., Fabbri, R., Poggi, E., Malizia, M., Bolognesi, C., Perrone, E., Gollo, E., Cossa, G.P., 2007. A biomonitoring study assessing the residual biological effects of pollution caused by the HAVEN wreck on marine organisms in the Ligurian Sea (Italy). Arch Environ Contam Toxicol. 53, 607-616.

Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. Comp. Biochem. Physiol. C 146, 281-300.

Viarengo, A.; Lafaurie, M.; Gabrielides, G.P.; Fabbri, R.; Marro, A., Roméo, M., 2000. Critical evaluation of an intercalibration exercise undertaken in the framework of the MED POL biomonitoring program. Mar. Environ. Res. 49, 1-18.