

Progetto - Projet

GEREMIA - Gestione dei reflui per il miglioramento delle acque portuali - Gestion des eaux usées pour l'amélioration des eaux portuaires



PRODOTTO T2.2.1: METODOLOGIA DI INDAGINE DA APPLICARE AI BIOINDICATORI E METALLI

LIVRABLE T2.2.2: MÉTHODOLOGIE DE ÉTUDE À APPLIQUER AUX BIOINDICATEURS ET AUX MÉTAUX

Partner responsable : Université de Toulon

Partenaires contributeurs : Università di Genova, Servizi Ecologici Porto di Genova, Autorità di Sistema Portuale del Mar Ligure Orientale, Istituto Superiore per la Protezione e Ricerca Ambientale, Istituto per lo studio degli impatti Antropici e Sostenibilità ambiente marino.

Nome del prodotto	Redatto da:	Verificato da:	Validato da:
T2.2.2 - Metodologia di indagine da applicare ai bioindicatori e metalli	Anna Reboa, Laura Cutroneo (UNIGE), Valentina Vitiello (ISPRA)	Marco Capello (UNIGE), Sara Dastoli, Maria Elena Piccione (ISPRA)	Alberta Mandich (UNIGE), Véronique Lenoble (UTLN)
Data :	23/11/2018	19/02/2019	25/02/2019

Description du livrable: Les méthodes d'études à appliquer aux bioindicateurs de la bioaccumulation et aux biomarqueurs (moules et mugillides) sont indiquées et une méthode innovante de quantification des métaux est proposée.

Descrizione del Prodotto: Sono indicate le metodologie di indagine da applicare ai bioindicatori per le analisi sul bioaccumulo e sui biomarkers (mitili e mugillidi) ed è proposta una metodologia innovativa per la quantificazione dei metalli.

Synthèse

Le projet GEREMIA fournit, en plus des tests écotoxicologiques, une autre approche concernant la composante biotique des zones d'étude, c'est-à-dire l'analyse des biomarqueurs, éventuelles modifications survenues à l'intérieur d'organismes vivants suite à un contact et une interaction avec facteurs de stress de différents types. En ce qui concerne les spécimens de Mugilidae, une étude histopathologique des branchies et du foie sera effectuée, ce qui est approprié pour observer les altérations physiologiques de ces tissus. En outre, un frottis sanguin sera produit pour chaque échantillon à analyser afin de vérifier les dommages génétiques, sur la base de la fréquence des micronoyaux. Enfin, l'analyse du système hépatique de l'enzyme P450, ainsi que celle des métabolites biliaires, fourniront d'autres indications sur l'activité détoxifiante du foie. Les analyses chimiques des poissons auront comme objet la quantification des métaux et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans les tissus hépatiques et musculaires. La recherche sur les moules sera concentrée également sur des analyses de biomarqueurs et chimiques. Les biomarqueurs à examiner sur des échantillons de *Mytilus galloprovincialis*, prélevés dans une mytiliculture et transplantés pour 4-5 semaines dans la zone d'étude, sont les suivants: stabilité des membranes lysosomales, activité de la phagocytose, accumulation de lipofuscine et de lipides neutres, contenu malondialdéhyde (MDA), prolifération des peroxyosomes, dommages génotoxiques, inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE), synthèse des métallothionéines, stimulation des enzymes antioxydantes. Parallèlement, des analyses

chimiques seront effectuées sur les organismes, en fonction de leur teneur en métaux lourds, HAP, biphényles polychlorés (BPC), tributylétain et pesticides organochlorés. Ce produit contient également la procédure d'analyse des traces de cuivre (Cu) dans la colonne d'eau. Dans ce cas, l'échantillon sera prélevé avec une bouteille Niskin et la teneur en Cu sera analysée par ICP-MS. En outre, afin d'obtenir une meilleure caractérisation, la teneur et la composition de la substance organique de l'échantillon seront également analysées, en mesurant la teneur en carbone organique dissous (TOC-VCSH) et en azote et en soufre (mesure CHNS). Enfin, à partir de l'échantillon d'eau prélevé, une caractérisation de l'abondance et de la diversité des communautés microbiennes présentes, par cytométrie en flux, sera également réalisée. Pour intégrer ces informations, une analyse moléculaire de ces derniers échantillons sera également réalisée par extraction d'ADN et PCR, afin d'analyser la diversité taxonomique et de prédire la diversité fonctionnelle des communautés, en se concentrant avant tout sur l'identification de certains groupes de phytoplancton: *Prochlorococco*, *Ostréococcus*, *Bathycoccus*, *Micromonas*. Toutes ces investigations permettront d'obtenir une image descriptive claire d'impact des principaux polluants présents dans la colonne d'eau des bassins portuaires sur la communauté biotique.

Sintesi

Il progetto GEREMIA prevede, in affiancamento ai test ecotossicologici, un ulteriore approccio relativo alla componente biotica delle aree di indagine, ovvero l'analisi dei biomarcatori, cioè eventuali modificazioni avvenute all'interno degli organismi viventi in seguito a contatto e interazione con contaminanti ambientali o agenti stressanti di vario tipo. Per quando riguarda gli esemplari di Mugilidae, verrà effettuata un'indagine istopatologica di branchie e fegato, atta a osservare alterazioni fisiologiche in tali tessuti. Inoltre, verrà prodotto, per ciascun esemplare, uno striscio ematico da analizzare per verificare il danno genetico, sulla base della frequenza dei micronuclei. Infine, l'analisi del sistema epatico enzimatico P450, in concomitanza con l'analisi dei metaboliti biliari, fornirà ulteriori indicazioni sull'attività detossificante del fegato. Le analisi chimiche sui pesci verteranno sulla quantificazione di metalli e idrocarburi policiclici aromatici (IPA) nei tessuti di fegato e muscolo. L'indagine da effettuarsi sui mitili verterà

anch'essa sia su analisi di biomarcatori che chimiche. I biomarcatori da esaminare su esemplari di *Mytilus galloprovincialis*, prelevati da un allevamento e trapiantati per circa 4-5 settimane nell'area di studio, sono i seguenti: stabilità delle membrane lisosomiali, attività di fagocitosi, accumulo di lipofusina e di lipidi neutri, contenuto di malondialdeide (MDA), proliferazione perossisomiale, danno genotossico, inibizione dell'acetilcolinesterasi (AChE), sintesi delle metallotioneine, stimolazione di enzimi antiossidanti. In parallelo, verranno eseguite analisi chimiche sugli organismi, in relazione al loro contenuto in metalli pesanti, IPA, policlorobifenili (PCB), tributilstagno, e pesticidi organoclorurati. Sempre all'interno di questo prodotto viene illustrato il procedimento per l'analisi di rame (Cu) in tracce nella colonna d'acqua. In questo caso il campione verrà prelevato tramite bottiglia Niskin e il contenuto in Cu verrà analizzato tramite ICP-MS. Inoltre, al fine di ottenere una migliore caratterizzazione, verrà analizzato anche il contenuto e la composizione della sostanza organica nel campione, misurando il contenuto di carbonio organico disciolto (TOC-VCSH) e azoto e zolfo (misurazione CHNS). Infine, a partire dal campione di acqua prelevato, sarà effettuata anche una caratterizzazione dell'abbondanza e della diversità delle comunità microbiche presenti, mediante citometria a flusso. Ad integrare queste informazioni, verrà anche effettuata un'analisi molecolare di quest'ultimi campioni tramite estrazione del DNA e PCR, al fine di analizzare la diversità tassonomica e prevedere la diversità funzionale delle comunità, concentrandosi soprattutto sull'identificazione di alcuni gruppi fitoplanctonici: *Prochlorococco*, *Ostréococcus*, *Bathycoccus*, *Micromonas*. Tutte queste indagini permetteranno di ottenere un chiaro quadro descrittivo del grado di impatto prodotto dai principali inquinanti che sono presenti nella colonna d'acqua dei bacini portuali sulla comunità biotica.

Index

1 Introduction	1
2. Les poissons comme bioindicateurs.....	2
2.1. Méthodologie d'enquête à appliquer aux poissons	3
2.1.1 Protocole à appliquer pendant la phase d'échantillonnage.....	5
2.1.2 Protocole à appliquer en laboratoire	7
2.2 Analyse des contaminants dans les tissus des poissons.....	13
3. Les moules comme bioindicateurs	14
3.1 Méthodologie d'enquête à appliquer aux moules.....	17
4. Métaux.....	31
4.1 Contamination par les métaux-traces.....	31
4.2 Les micro-organismes marins comme indicateurs de l'état du milieu	33
Bigliographie	36

1 Introduction

La biosurveillance est une méthode d'investigation d'un site spécifique, qui est appliquée sans altérer l'environnement observé et donc dans des conditions naturelles : en observant l'état de santé d'organismes sélectionnés, appelés bio-indicateurs, vivant dans la zone investiguée, il est possible de revenir aux conditions réelles dans lesquelles se trouve l'environnement extérieur, en corrélant la présence de polluants ou d'agents stressants avec les effets identifiés par l'analyse sur ces organismes (Pretti et Cognetti-Varriale, 2001 ; Gupta et Singh, 2011).

La biosurveillance présente donc des avantages :

- 1) elle révèle la présence d'altérations sublétales, donc avant que l'état de santé des organismes ne soit irrémédiablement compromis ;
- 2) elle reflète la présence d'un élément de stress dans l'environnement externe ;
- 3) il s'agit d'une méthode très sensible ;
- 4) elle détecte la toxicité chronique des polluants même lorsqu'ils sont présents à des niveaux analytiquement inobservables ou lorsque l'exposition a déjà cessé (Zhou *et al.*, 2008).

Il est cependant nécessaire de compléter cette méthode par celle des analyses chimiques, qui doivent être effectuées tant sur le compartiment biotique que sur le milieu environnant. Cette approche en parallèle est essentielle pour comprendre quels types de contaminants sont présents et ont réellement interagi avec les organismes vivants, étant ainsi des causes possibles d'une éventuelle altération de leur état de santé (Zhou *et al.*, 2008 ; Gupta et Singh, 2011). La biosurveillance est donc une méthode utile pour identifier un changement dans le temps des conditions potentiellement nocives de l'environnement étudié, ou pour comparer une zone potentiellement compromise, comme les eaux portuaires, avec un site témoin (Ravera, 2001). Le choix des matrices et des paramètres physico-chimiques, écotoxicologiques et biologiques à analyser pour l'évaluation de la qualité des eaux portuaires et le développement d'outils de gouvernance pour leur gestion (Produit T2.2.1) a été effectué sur la base de l'analyse des pressions potentielles sur ce type d'environnement et en tenant compte des principales réglementations communautaires, nationales (italiennes et françaises) et régionales qui

traitent et fournissent des indications sur la façon de surveiller et de gérer les eaux (Produit T1.1.1).

L'évaluation de la qualité des eaux portuaires doit être abordée en gardant à l'esprit que les polluants inorganiques et organiques rejetés dans l'eau, une fois adsorbés ou incorporés dans les matières particulaires en suspension (biotiques et/ou abiotiques), ont tendance à se déposer sur le fond marin et à entrer en contact avec les organismes benthiques ou d'autres types d'organismes par le biais de la chaîne alimentaire (Ciborowski et Corkum, 1988 ; Giesy *et al.*, 1988 ; Schloesser, 1988 ; Giesy et Hoke, 1989 ; 1990).

De plus, les polluants peuvent redevenir disponibles dans les sédiments par des phénomènes de remise en suspension et de relargage (Lee *et al.*, 1978 ; Jones et Lee, 1978 ; Malueg *et al.*, 1983 ; Nebeker *et al.*, 1983).

Il est donc nécessaire de mener des investigations non seulement sur les matrices eau et sédiments, mais aussi sur le compartiment biotique, qui est un élément fondamental pour l'évaluation de la qualité des eaux portuaires.

2. Les poissons comme bioindicateurs

Pour être considéré comme un bon bio-indicateur, un organisme doit posséder certaines caractéristiques : 1) capacité à accumuler des polluants à des niveaux élevés, sans subir d'effet létal ; 2) pas trop mobile, afin de représenter le milieu concerné ; 3) abondant et largement distribué, afin de pouvoir effectuer des échantillonnages répétés ; 4) long cycle de vie ; 5) anatomie, physiologie et éthologie connues ; 6) échantillonnage et traitement faciles en laboratoire ; 7) rôle écologique et position dans le réseau trophique pertinent ; 8) capacité à montrer une relation dose-effet. Étant donné qu'il est difficile d'avoir un organisme qui possède toutes ces caractéristiques, il faut en choisir un qui en reflète la plupart en fonction de l'objectif de la surveillance (Zhou *et al.*, 2008). Les poissons jouent certainement un rôle écologique primordial, se situant dans la partie la plus haute de la pyramide alimentaire, et fonctionnant ainsi comme transporteurs d'énergie d'un niveau trophique à l'autre ; en outre, ils constituent une source importante d'alimentation pour les humains, acquérant ainsi également une forte valeur commerciale (El-Moselhy *et al.*, 2014). En outre, les poissons possèdent également

d'autres des caractéristiques d'un bon bioindicateur, ce qui en fait un choix approprié pour une étude de biosurveillance : anatomie, physiologie et éthologie parmi les mieux connues et étudiées dans la littérature en milieu aquatique ; longs cycles de vie ; facilité d'échantillonnage ; large gamme de tolérance aux changements environnementaux et capacité à bioaccumuler les polluants ; identification facile ; large distribution (Zhou *et al.*, 2008 ; Murtala *et al.*, 2012 ; Arockia Vasanthi *et al.*, 2013). Les mugilidés jouent un rôle écologique important dans les environnements marins côtiers car, bien qu'étant des espèces pélagiques, ils maintiennent un contact très étroit et fréquent avec le sédiment, filtrant à la fois la couche superficielle du fond marin et les particules en suspension dans la colonne d'eau (Arockia Vasanthi *et al.*, 2013). En particulier, le *Mugil cephalus* (mulet commun ou mulet) est particulièrement fréquent près des côtes, ainsi que dans les environnements portuaires, où l'on trouve des spécimens formant de vastes bancs. De plus, c'est une espèce largement utilisée dans les études de surveillance ou de toxicologie, et donc bien documentée dans la littérature, grâce à son large éventail de tolérance aux variations des paramètres environnementaux. Enfin, cette espèce possède une valeur nutritionnelle et gastronomique importante, de nature à lui conférer un fort intérêt commercial (Ben Ameer *et al.*, 2012). Ces facteurs font de *Mugil cephalus* le candidat idéal pour une étude de surveillance de la qualité des eaux portuaires.

2.1. Méthodologie d'enquête à appliquer aux poissons

Les éléments de preuve sélectionnés à appliquer aux poissons en tant que bioindicateurs sont les suivants : analyse des micronoyaux, histopathologie des branchies et du foie, analyse de l'activité enzymatique du cytochrome P450 et analyse des métabolites biliaires. Ces méthodologies ont été choisies parce qu'elles fournissent des indications directes et réelles de l'état de santé réel des spécimens échantillonnés, avec les effets qui en découlent sur les populations et les communautés, ce qui est l'objectif principal de ce type d'investigation (Au, 2004). L'analyse de *biomarker* tels que l'activité enzymatique du cytochrome P450 est très intéressante pour étudier la réponse physiologique des organismes cibles à l'exposition à des substances organiques xénobiotiques telles que les HAP et les PCB. En parallèle, s'ajoute l'analyse des métabolites biliaires, qui a un rôle complémentaire dans la caractérisation de

l'exposition et du métabolisme des bioindicateurs vis-à-vis des HAP (Gorbi et Regoli, 2004). Cependant, seul ce type d'analyse n'est pas suffisant car il n'apporte pas de réponses précises sur la manière dont les capacités de survie des bioindicateurs sont altérées, ces conséquences étant très variables et non définitives (Poleksić *et al.*, 2010). D'autre part, les dommages au matériel génétique, comme ceux dont découle la présence de micronoyaux, constituent une conséquence grave qui peut être clairement interprétée même si elle n'est pas spécifique, car la génotoxicité compromet sans aucun doute le fonctionnement des cellules dans lesquelles elle se produit, entraînant également des effets héréditaires qui peuvent être liés à un déclin des populations (Suarez Rocha *et al.*, 2009). De même, l'histopathologie fournit la preuve que l'exposition à des éléments de stress dans l'environnement a modifié la structure d'un tissu, et par conséquent le fonctionnement de l'organe qui le constitue (Giari *et al.*, 2008). Le choix des tissus à examiner s'est porté sur les branchies et le foie, car ce sont deux organes fondamentaux pour la survie des poissons. Les branchies sont un organe multifonctionnel, responsable non seulement de la respiration, mais aussi de : l'ionisation et l'osmo-régulation, l'équilibre acide-base, l'excrétion des produits azotés, l'échange thermique, la production de mucus (Au, 2004). De plus, les branchies présentent un tissu de surface très étendu qui entre en contact direct avec le milieu extérieur et donc avec les éléments nocifs qu'il contient (Abrahamson, 2007 ; Figueiredo-Fernandes *et al.*, 2007). Le foie, quant à lui, est l'organe qui joue principalement un rôle dans la transformation et la détoxification des molécules endogènes et exogènes, et donc une cible directe des contaminants environnementaux, qui s'y accumulent facilement en raison de leur lipophilie (Abdel-Moneim *et al.*, 2012). Enfin, ces deux tissus sont les plus utilisés dans les études de surveillance qui exploitent l'histopathologie comme *biomarker*, car le grand intérêt pour ces organes a permis le développement de méthodes d'analyse semi-quantitatives qui fournissent un indice numérique, et se prêtent ainsi à la création d'un protocole standardisé (Bernet *et al.*, 1999 ; Richardson *et al.*, 2010 ; Mitchell *et al.*, 2012 ; Van Dyk *et al.*, 2012). Le protocole présenté dans cet article est basé sur la littérature antérieure, et exploite à la fois les paramètres les plus significatifs et les plus facilement identifiables, en essayant d'éliminer le principal inconvénient de l'histopathologie, à savoir une interprétation différente des altérations par différents opérateurs, en fonction de leur

expérience. En outre, ces méthodes sont applicables sans l'utilisation de machines complexes, et donc facilement reproductibles. Enfin, le choix des lignes de preuve s'est porté sur des *biomarker* non spécifiques ou presque non spécifiques, précisément parce que, dans un environnement non contrôlé, des contaminants de différents types et sous forme de mélanges sont présents, qui agissent donc avec des effets très variables et difficiles à interpréter sur la santé des organismes exposés (Poleksić *et al.*, 2010). Par conséquent, en utilisant des sources de preuves non spécifiques qui reflètent l'altération réelle des capacités de survie des poissons, il est possible d'étudier l'état de contamination des environnements même avec des éléments de stress différents.

2.1.1 Protocole à appliquer pendant la phase d'échantillonnage

Les spécimens de *Mugil cephalus* sont capturés à la ligne ou au filet et conservés en mer dans des filets jusqu'au sacrifice, afin d'éviter toute souffrance due au changement de température ou à l'anoxie. Les poissons doivent être de taille similaire, afin de disposer de spécimens d'une tranche d'âge restreinte, et avec une répartition égale des sexes (éventuellement 50% de mâles et 50% de femelles). Le sacrifice doit être effectué le plus rapidement possible, en évitant également d'abîmer les tissus d'intérêt : la méthode la plus efficace est un coup sec et rapide au niveau du cerveau, suivi d'une dislocation cervicale. Chaque spécimen doit être photographié, pesé et la longueur totale (du bout du museau à l'extrémité de la queue) et la longueur standard (du bout du museau à la partie centrale où la queue se divise) doivent être mesurées.

Un échantillon de sang périphérique doit être prélevé sur la branchie ou le pédoncule caudal de chaque poisson à l'aide d'une seringue imprégnée d'héparine (en veillant à ce que les parois de la seringue soient mouillées d'héparine de sodium avant le prélèvement). Pour chaque échantillon, une goutte de sang doit être étalée sur la lamelle étiquetée de manière appropriée et laissée sécher à l'air libre pendant au moins 1 à 2 heures.

Équipés d'instruments de dissection (ciseaux, scalpels, pinces), les organes nécessaires à l'histologie, c'est-à-dire le foie et les branchies, sont prélevés. Les organes doivent être immédiatement fixés en plaçant une partie d'entre eux dans un pot en plastique étiqueté

(d'une capacité de ~50 ml avec un bouchon à vis et un sous-bouchon), contenant une solution de liquide de Bouin et d'acide acétique (20:1) dans la quantité nécessaire pour maintenir les échantillons complètement immergés. La solution doit être préparée immédiatement avant l'échantillonnage et, jusque-là, seul l'acide acétique doit être stocké à des températures supérieures à 17 °C pour éviter le gel. On prélève d'abord la branchie, en échantillonnant toujours la deuxième branchie et toujours du même côté du poisson, en utilisant les instruments appropriés et en évitant autant que possible le contact avec les filaments afin de ne pas créer une altération fictive du tissu. Si la branchie est petite, l'arc entier doit être fixé, sinon seule la partie centrale doit l'être. Toutes les branchies restantes doivent être retirées et placées sur de la glace, puis stockées à -20 °C, en vue d'une analyse chimique : la moitié sera placée dans un *falcon* pour l'analyse des métaux et l'autre moitié sera fermée dans des sachets en aluminium pour l'analyse des HAP. Ensuite, on fait une légère et petite incision avec le scalpel, antérieurement et perpendiculairement à la nageoire anale, en faisant attention à ne pas toucher les tissus internes ; on introduit la pointe des ciseaux dans le trou et on continue à couper superficiellement vers le dos et jusqu'à la hauteur de la nageoire latérale, afin d'enlever entièrement la peau d'un côté jusqu'à découvrir les organes, en pouvant coucher le poisson sur le côté non ouvert. À ce stade, le foie entier est retiré, en le manipulant avec précaution pour éviter d'ouvrir la vésicule biliaire. La vésicule biliaire est d'abord retirée et congelée dans un cryotube avec de l'azote liquide ou de la glace sèche, puis conservée à -80 °C pour l'analyse ultérieure des métabolites biliaires. En cas d'ouverture de la vésicule biliaire, il faut retirer le maximum de bile à l'aide d'une pipette et la congeler de la même manière. Ensuite, passez au foie et coupez délicatement une partie centrale, ne dépassant pas ~5 mm d'épaisseur, qui sera fixée à l'intérieur du bocal pour l'histologie avec la branchie déjà prélevée. En outre, une petite portion du foie (~500 mg), en double exemplaire, doit être congelée dans un cryotube étiqueté, avec de l'azote liquide ou de la glace sèche, et conservée à -80 °C, pour une analyse ultérieure de l'activité enzymatique du cytochrome P450. La partie restante du foie doit être prélevée et placée sur de la glace, puis conservée à -20 °C, en vue d'une analyse chimique : la moitié du foie restant doit être placée dans un *falcon* pour l'analyse des métaux et l'autre moitié doit être

scellée dans des paquets d'aluminium pour l'analyse des HAP. La tête peut également être congelée et stockée pour l'identification de l'âge des poissons par analyse des otolithes.

2.1.2 Protocole à appliquer en laboratoire

ANALYSE DES MICRONOYAUX

Les lames de frottis sanguin doivent être fixées dans du méthanol pendant 3 minutes et laissées sécher avant d'effectuer la coloration de Giemsa et l'analyse des micronoyaux (Suarez Rocha et al., 2009). Les solutions de coloration Giemsa sont préparées selon la méthodologie suivante : solution tampon pH 7,2, en diluant 1 comprimé dans de l'eau distillée selon les instructions du fabricant ; solution de coloration Giemsa, en diluant la solution de bleu azur-éosine-méthylène avec la solution tampon, selon les instructions du fabricant.

La coloration de Giemsa est effectuée, par les étapes suivantes :

- Immersion dans la solution de coloration Giemsa diluée : 20 minutes
- Lavage dans le tampon pH 7.2 : 1 minute
- Deuxième lavage dans le tampon pH 7.2 : 1 minute
- Séchage à l'air

Les lames ainsi préparées peuvent être visualisées immédiatement à l'aide d'une huile pour microscopie à immersion, ou bien elles peuvent être conservées après un passage rapide au xylène (type Bio-Clear, Bio-Optica) et une fermeture avec un milieu anhydre (type Eukitt) et un couvre-objet.

Pour chaque spécimen, 200 érythrocytes doivent être comptés :

- Cellules de forme ovale avec un cytoplasme intact
- cellules à noyau ovale et membrane nucléaire intacte
- Micronoyaux équivalant à un tiers du noyau au maximum
- Micronoyaux clairement séparés du noyau.

Les résultats doivent être rapportés en fréquence de cellules présentant des micronoyaux par rapport au nombre total de cellules comptées par spécimen.

ANALYSE HISTOPATHOLOGIQUE DU FOIE ET DES BRANCHIES

24 h après l'échantillonnage, les échantillons de branchies et de foie destinés à l'histologie doivent être transférés dans de l'éthanol à 70 % après un lavage rapide dans l'eau où ils doivent rester pendant au moins 24 h mais peuvent être conservés pendant plusieurs mois. Afin de procéder à l'inclusion, il est nécessaire de déshydrater les échantillons dans une série ascendante d'éthanol, comme décrit :

- 24 h dans de l'éthanol à 80 %.
- 1 h dans de l'éthanol à 90 %.
- 1 h dans l'éthanol 95
- 2 passages de 30' dans de l'éthanol à 100%.
- passages en 5' dans de l'éthanol (100%)/Bio-Clear (1:1)
- 2 x 1' incréments en Bio-Clear
- 2 passages de 1 h dans de la paraffine liquide (Bioplast, Bio-Optica) à 50 °C
- Inclusion de paraffine en utilisant les bases et les cassettes appropriées (Bio-Optica)

Il est recommandé d'utiliser une plaque chauffante sur laquelle placer les bases et les cassettes pendant l'enrobage pour éviter une solidification rapide de la paraffine. Veillez à éliminer toute bulle d'air à l'intérieur de la base, qui créerait des fractures lors de la découpe.

Une fois secs, la base des échantillons inclus est retirée et des sections de 4 µm d'épaisseur sont coupées à l'aide d'un microtome. Au moins trois lames sont préparées pour chaque échantillon, avec trois ou quatre sections contiguës chacune.

Les lames doivent être laissées sécher complètement et exemptes de poussière avant de colorer au moins une lame par échantillon à l'hématoxyline/éosine selon les étapes suivantes :

- 2 étapes de 1/2 h chacune en Bio-Clear
- Hydratation dans des séries décroissantes d'éthanol, avec des étapes de ~2' chacune (2 étapes dans l'éthanol à 100%, 2 étapes dans l'éthanol à 95%, 1 étape dans l'éthanol à 90%, 1 étape dans l'éthanol à 80%)
- Lavage à l'eau du robinet
- Passage dans l'hématoxyline pendant ~5' (par immersion ou en plaçant des gouttes pour recouvrir les sections)

- Laver à l'eau courante du robinet
- Lavage à l'eau distillée
- Passage dans l'éosine pendant ~1' (par immersion ou en ajoutant des gouttes pour couvrir les sections)
- Lavage à l'eau distillée (très rapide pour éviter l'élimination de l'éosine)
- Déshydratation dans des séries d'éthanol avec des étapes de ~30" chacune (1 étape dans l'éthanol à 80%, 1 étape dans l'éthanol à 90%, 2 étapes dans l'éthanol à 95%, 2 étapes dans l'éthanol à 100%)
- 10' dans Ethanol (100%)/Bio-Clear (1:1)
- 2 passes de ~10' chacune en Bio-Clear
- Monter avec un milieu anhydre (tel que Eukitt, Bio-Optica) et une lamelle couvre-objet.
- Laisser sécher à l'air libre

Une fois sec, procéder à l'analyse par observation avec des photographies au microscope optique, en utilisant les protocoles suivants.

FOIE

Le protocole modifié de Bernet et al. (1999), avec des ajustements de Richardson et al. (2010) et Van Dyk et al. (2012) sera utilisé.

Pour chaque spécimen, une lame sera analysée avec une coloration à l'hématoxyline/éosine et pour chaque spécimen, 9 champs aléatoires de la section seront analysés (grossissement 20x).

Les altérations, observées pour chaque champ, sont les suivantes :

- Congestion des navires (w=1)
- Hémorragie (w=1)
- Centres de mélanomacrophages (w=1)
- Infiltration de granulocytes (w=2)
- Stéatose (w=1)
- Hyalinisation (w=1)
- Changement hydropique (w=1)
- Perte de la structure du cordon (w=1)

- Dégénérescence du stroma hépatique (w=1)
- Nécrose (w=3),

où la valeur w indique le degré de réversibilité :

1. Altération facilement réversible à la fin de l'exposition
2. Altération modérée, parfois réversible à la fin de l'exposition
3. Déficience irréversible.

Pour chaque déficience, un score (a) est attribué en fonction de son étendue dans chaque champ visuel analysé :

- 0 = non observé
- 2 = légère (limitée à des cellules uniques ou à une zone de moins de 10% du champ)
- 4 = présence modérée (zone occupant entre 10% et 50% du champ)
- 6 = présence sévère (zone occupant plus de 50% du champ)

On calcule ensuite la moyenne de la note (a) attribuée à chaque altération dans les différents champs de la section.

Le score moyen (a) obtenu pour chaque perturbation est multiplié par la valeur w correspondante. La somme des valeurs ainsi obtenues pour chaque altération donne la valeur de l'indice de santé du foie pour chaque spécimen (Liver Index).

$$LI = \sum_{alt} (a \cdot w)$$

L'indice ainsi obtenu permet de comparer l'état de santé du foie de différents poissons sur différents sites. Les altérations individuelles ne peuvent pas être comparées entre elles une fois que le score a été donné, afin de ne pas surestimer ou sous-estimer. Afin d'effectuer une telle comparaison et de mettre en relation les altérations individuelles avec les données de l'analyse chimique, il est nécessaire d'utiliser des données qualitatives simples de présence/absence d'altérations.

BRANCHES

Le protocole modifié de Bernet et al. (1999) avec des ajustements de Mitchell et al. (2012) sera utilisé.

Pour chaque spécimen, une lame est analysée avec une coloration à l'hématoxyline/éosine et pour chaque spécimen, 9 champs aléatoires de la section sont analysés (chaque champ englobe 10 lamelles secondaires).

Les altérations, observées pour chaque champ, sont les suivantes :

- Congestion des navires (w=1)
- Hémorragies ou anévrysmes (w=1)
- Infiltration de granulocytes (w=2)
- Hypertrophie de l'épithélium des lamelles secondaires (w=1)
- Hyperplasie de l'épithélium des lamelles secondaires (w=2)
- Hyperplasie de l'épithélium des lamelles primaires (w=2)
- Raccourcissement des lamelles secondaires (w=1)
- Fusion complète des lamelles secondaires (w=2)
- Soulèvement de l'épithélium des lamelles secondaires (w=1)
- Nécrose (w=3)

où la valeur w indique le degré de réversibilité :

1. Altération facilement réversible à la fin de l'exposition
2. Altération modérée, parfois réversible à la fin de l'exposition
3. Déficience irréversible.

Pour chaque déficience, un score (a) est attribué en fonction de son étendue dans chaque champ visuel analysé :

- 0 = non observé
- 2 = légère (limitée à une seule lame ou à une zone de moins de 10% du champ)
- 4 = présence modérée (zone occupant entre 10% et 50% du champ)
- 6 = présence sévère (zone occupant plus de 50% du champ)

On calcule ensuite la moyenne de la note (a) attribuée à chaque altération dans les différents champs de la section.

Le score moyen (a) obtenu pour chaque perturbation est multiplié par la valeur w correspondante. La somme des valeurs ainsi obtenues pour chaque altération donne la valeur de l'indice de santé des branchies pour chaque spécimen (Gills Index).

$$GI = \sum_{alt} (a \cdot w)$$

L'indice qui en résulte permet de comparer l'état de santé des branchies de différents poissons sur différents sites. Les altérations individuelles ne peuvent pas être comparées entre elles une fois que la note a été attribuée, afin d'éviter toute surestimation ou sous-estimation. Des données qualitatives simples sur la présence/absence d'altérations doivent être utilisées pour effectuer cette comparaison et relier les altérations individuelles aux données d'analyse chimique.

En additionnant le LI et le GI pour chaque échantillon, on obtient un indice de santé globale pour chaque individu (I), qui peut être utilisé pour comparer différents spécimens provenant de différents sites.

$$I_n = LI_n + GI_n$$

ANALYSE DU CYTOCHROME P450

L'induction du complexe multi-enzyme du cytochrome P450 est déterminée en analysant la formation de résorufine par spectrofluorimétrie.

Les échantillons de foie sont homogénéisés à un rapport poids:volume de 1:5 dans un tampon de travail composé de tampon K-phosphate 100 mM pH 7,5, KCl 150 mM et acide éthylène-diamino-tétraacétique (EDTA) 1mM. Les homogénats obtenus sont centrifugés à 12 000 xg pendant 15 minutes et le surnageant est conservé sur la glace. Au moment de l'analyse, un volume de 100 µL de surnageant est incubé à 30°C dans un volume final de 1 mL contenant un tampon K-phosphate 100 mM pH 7.5, 4 µM 7-éthoxyrésorufine, et 0.25 mM NADPH. Après 2-5 minutes, la réaction est arrêtée en ajoutant 2 mL d'acétone. Un "blanc" correspondant doit être préparé pour chaque échantillon, obtenu en préparant une solution d'incubation identique à celle des échantillons mais en arrêtant la réaction au temps zéro. Les deux échantillons et les "blancs" sont ensuite centrifugés à 4 000 xg pendant 5 minutes et le surnageant prélevé est lu dans le spectrofluorimètre avec les paires de longueurs d'onde (λ) d'excitation à 535 nm et d'émission à 585 nm. L'activité enzymatique est quantifiée en fonction de la quantité de

résorufine produite pendant le temps de réaction. Les niveaux de résorufine dans les échantillons sont quantifiés à l'aide d'une ligne standard de concentrations connues de résorufine (0,02-1 μM) diluée dans un tampon K-phosphate 100 mM pH 7,5. Les valeurs d'activité sont rapportées aux protéines de l'échantillon et exprimées en pmol/minute/mg de protéines.

ANALYSE DES MÉTABOLITES BILIAIRES

Au moment du dosage, les vésicules biliaires doivent être décongelées et vidées de leur contenu biliaire. Une aliquote de bile est immédiatement diluée à un rapport de 1:1000 ou plus dans de l'éthanol à 50% pour l'analyse spectrofluorimétrique. Avec la méthode de fluorescence à longueur d'onde fixe (FF), le signal de fluorescence d'un échantillon est mesuré à une paire de longueurs d'onde d'excitation et d'émission spécifiques, propres à chaque type de métabolite. Les paires optimales de longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont : 290/335 nm pour les métabolites du naphthalène ; 341/383 nm pour les métabolites du pyrène ; 380/430 nm pour les métabolites du benzo[a]pyrène. La fluorescence des échantillons est mesurée aux trois paires de longueurs d'onde différentes, et les valeurs obtenues sont quantifiées par rapport à trois courbes d'étalonnage obtenues avec des étalons de 1-OH-naphtol (0,3-1,6 $\mu\text{g/mL}$) pour les métabolites du naphthalène, de 1-OH-pyrène (0,4-21 ng/mL) pour les métabolites du pyrène, et de benzo[a]pyrène (0,5-12 ng/mL) pour les métabolites du benzo[a]pyrène. Les résultats sont exprimés en fonction du type de métabolites : $\mu\text{g/mL}$ de bile ou mg/mL.

2.2 Analyse des contaminants dans les tissus des poissons

MÉTAUX LOURDS

La teneur en métaux (Sb, As, Al, Cd, Cr, Fe, Mn, Hg, Ni, Pb, Cu, Zn) des tissus hépatiques et musculaires de chaque spécimen est quantifiée par spectroscopie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP-OES) selon les étapes suivantes :

1. Détermination du poids humide de chaque spécimen

2. Digestion de l'échantillon par un processus de minéralisation à l'eau régale (Méthode 3050B corrigée avec le protocole UNI EN 13657:2004 pour les échantillons organiques), qui nécessite :
 - addition de 9 mL d'acide chlorhydrique (HCl) et de 3 mL d'acide nitrique (HNO₃)
 - après 24 h à température ambiante, transférer dans un digesteur (Digi block ED36S) à 40 °C pendant ~1 h en ajoutant quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène pur (H₂O₂)
 - en portant la température à 95 °C pendant ½ heure
 - dilution de l'échantillon à un volume de 100 mL.
3. Détermination des métaux traces (Méthode 6010D) par ICP-OES (Optima 8300)

HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAP)

L'identification et la quantification des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans les muscles des poissons sont réalisées par chromatographie liquide à haute performance (CLHP). Dans l'analyse HPLC, les matériaux de garnissage les plus couramment utilisés consistent en des particules de silice liées chimiquement à des chaînes d'hydrocarbures linéaires C18. Des détecteurs UV et de fluorescence sont utilisés, généralement en série. Le détecteur de fluorescence est plus sensible et sa spécificité permet la détermination des HAP en présence de substances interférentes non fluorescentes. Le détecteur UV à barrettes de diodes (UV-DAD) permet de confirmer l'identification des pics chromatographiques par les spectres UV acquis pendant l'élution (Bocca *et al.*, 2003).

3. Les moules comme bioindicateurs

Comme les poissons, les mollusques bivalves, en particulier les espèces typiques des environnements de transition, possèdent des caractéristiques qui en font un outil valable pour le suivi de la contamination des environnements côtiers, dans le cadre d'une approche qui intègre l'évaluation des paramètres chimiques et physiques avec l'évaluation des effets sur l'écosystème.

En tant qu'organismes filtrants, ils peuvent accumuler dans leurs tissus de nombreux polluants inorganiques et organiques présents dans l'eau (fraction dissoute), dans le phytoplancton dont ils se nourrissent et dans les particules en suspension (Bryan et Langston, 1992 ; Adam et Shorey, 1998 ; Wang et Fisher, 1999 ; Byrne et Vesk, 2000). Leur tolérance à un large éventail de conditions environnementales et leur incapacité à réguler la concentration tissulaire des substances xénobiotiques, en raison de l'absence de mécanismes biochimiques ou physiologiques spécifiques, constituent des facteurs qui facilitent leur bioaccumulation dans leurs tissus (Viarengo et al., 2007 ; Girón-Pérez, 2010). De plus, la sessilité presque totale à partir du stade de développement post-larvaire et le long cycle de vie rendent ces organismes représentatifs des milieux qu'ils habitent. Largement et abondamment distribués dans la plupart des zones côtières du monde (Ortiz-Zarragoitia et Cajaraville, 2006), les bivalves sont facilement trouvés dans la nature dans le cas d'études sur les populations naturelles ; alternativement, leur découverte est extrêmement facile grâce à la présence répandue de fermes spécialisées dans la production et la commercialisation à des fins alimentaires de ce type d'organismes. L'anatomie, la physiologie et l'éthologie de ces mollusques sont largement connues en raison de leur large diffusion dans l'environnement et de leur élevage.

L'échantillonnage des organismes dans l'environnement est facile à réaliser, l'identification ne nécessite pas l'intervention d'experts taxonomistes et les méthodes de traitement pour les analyses de laboratoire ultérieures sont largement connues.

De plus, les bivalves jouent un rôle important dans la pyramide alimentaire car ils constituent une source importante de nutrition pour les humains et sont donc un véhicule possible pour le transfert des contaminants à travers la chaîne trophique.

Ces caractéristiques font des bivalves d'excellents bio-indicateurs dans les études de bioaccumulation qui, exploitant leur capacité à concentrer des quantités relativement élevées de polluants, même à partir de solutions diluées, signalent la présence de polluants dans des environnements où leur concentration dans l'eau est inférieure aux limites de sensibilité des méthodes analytiques couramment utilisées (Beone et Ravera, 2003).

Parmi les bivalves les plus couramment utilisés comme bio-indicateurs, il y a la moule (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck), largement répandue dans les environnements côtiers et également

élevée en Méditerranée ; cette espèce est utilisée pour vérifier les niveaux de contaminants accumulés au moyen de la méthodologie définie comme *Mussel watch*, développée dans les années 1970 (Goldberg, 1975) et appliquée dans des programmes de surveillance internationaux pour évaluer les tendances dans l'espace et dans le temps des concentrations de contaminants dans les régions côtières et estuariennes (Scarpato et al, 2006 ; Phillips et Segar, 1986 ; de Kock et Kramer, 1994 ; O'Connor et al., 1994). Par rapport à la méthodologie développée dans les années 1970, celle définie comme la surveillance active des moules (Andral, 2004) se caractérise par quelques innovations fondamentales : la transplantation des moules a lieu de manière hautement standardisée, en utilisant des méthodes rapides et efficaces de pose et de récupération ; toutes les moules proviennent de fermes situées dans des zones non perturbées, résultant ainsi homogènes en termes de taille et de statut métabolique ; les organismes sont transplantés dans des cages, immergées sous le niveau de navigation, réduisant le risque de perte liée à la navigation et au vandalisme (Scarpato et al., 2006).

Après une période définie de maintien dans l'environnement étudié, les organismes récupérés peuvent être utilisés pour la détermination analytique des contaminants bioaccumulés ainsi que pour effectuer des investigations au niveau moléculaire, cellulaire, histologique, morphologique et physiologique afin de vérifier les changements induits par un ou plusieurs contaminants ; ces altérations (biomarker) (Fossi, 2001 ; Bianchi et Morri, 2003) peuvent anticiper les changements dans les plus hauts niveaux d'organisation biologique (populations, communautés, écosystèmes) (Sandulli, 2004). Par conséquent, ils sont des indicateurs rapides des effets biologiques, dus aux contaminants chimiques, qui se produisent plus lentement dans le temps (Ortiz-Zarragoitia et Cajaraville, 2006).

Des études récentes indiquent également que les moules sont des organismes appropriés pour évaluer les effets des contaminants sur les mécanismes physiologiques impliqués dans la signalisation cellulaire et le contrôle de la réponse au stress (Martin-Diaz et al., 2009 ; Franzellitti et al., 2011).

Pour la définition de la qualité du biote, outre l'analyse de la teneur en polluants dans les tissus d'organismes bioindicateurs spécifiques (par exemple, les moules et les moules) et les

enquêtes écotoxicologiques réalisées à l'aide d'une batterie de tests avec des organismes appartenant à au moins trois niveaux trophiques différents, l'analyse d'indicateurs biochimiques particuliers (biomarker) dans les organismes cibles permet de mettre en évidence des altérations de voies métaboliques particulières (Foulkes, 1982 ; Klaverkamp et al, 1991 ; Malins et Ostrander, 1994 ; Munawar et al., 1995 ; Fossi, 2000) également induites par de faibles concentrations de polluants.

Les paramètres physiques et physicochimiques des sédiments et de la colonne d'eau sont également analysés afin de soutenir les investigations chimiques et biologiques et de permettre d'identifier les effets primaires et secondaires sur la qualité de l'eau induits par des pressions d'origine différente.

3.1 Méthodologie d'enquête à appliquer aux moules

La surveillance est effectuée en utilisant la technique des organismes transplantés selon les indications données dans la description " Bioaccumulation dans les bivalves, SCHEDULE 1 - Utilisation des mollusques bivalves dans le programme de surveillance de l'environnement côtier (Protocole *Mussel Watch*) " du volume " Méthodologies analytiques de référence " préparé par le Ministère de l'Environnement et de la Protection du Territoire et l'ICRAM en 2011.

Des spécimens de *Mytilus galloprovincialis* sont prélevés dans une population provenant d'un site de reproduction et transférés, sans hébergement, pour une période de 4-5 semaines dans les zones à surveiller.

Environ 200-300 individus de taille homogène (5-7 cm), soit environ entre 70 et 90% de la taille maximale de la population dans laquelle ils ont été prélevés, sont transplantés dans chacune des stations étudiées.

La transplantation s'effectue en maintenant les organismes dans des filets en nylon ou des structures en plastique fixés dans la station à surveiller, à une profondeur comprise entre 1 et 5 m et à au moins un mètre du fond.

Après la période in situ, les moules sont récupérées, si nécessaire maintenues réfrigérées à environ 4 °C dans un environnement humide (mais pas immergées dans l'eau) pendant un

maximum de 24 heures, puis disséquées et préparées pour les analyses chimiques et toxicologiques ultérieures.

Pour chaque point d'échantillonnage, quatre pools (trois répliques et un pool de réserve) sont préparés, chacun étant généralement constitué des parties molles entières d'environ 10 organismes, pour chaque type d'analyse à effectuer (par exemple, éléments traces et contaminants organiques). Les tissus mous des moules sélectionnées sont collectés, lavés avec de l'eau désionisée (Milli Ro) et congelés à -20 °C jusqu'à l'analyse.

En relation avec les objectifs spécifiques du projet, il a été décidé de rechercher les mêmes paramètres analysés dans les moules que ceux analysés dans les sédiments, en tenant compte des indications données dans les réglementations nationales et internationales concernant le contrôle et la gestion des eaux (Produit T1.1.1 Rapport sur les réglementations et les protocoles de gestion environnementale) :

- métaux lourds: arsenic, cadmium, chrome total, cuivre, mercure, nickel, plomb, zinc et chrome hexavalent, vanadium, aluminium et fer comme paramètres supplémentaires;
- Hydrocarbures aromatiques polycycliques: Acénaphthylène, Benzo(a)anthracène, Fluoranthène, Naphtalène, Anthracène, Benzo(a)pyrène, Benzo(b)fluoranthène, Benzo(k)fluoranthène, Benzo(g,h,i)pérylène, Acénaphthène, Fluorène, Phenanthrène, Pyrène, Dibenzo(a,h)anthracène, Chrysène, Indeno(1,2,3,c-d)pyrène et leur somme;
- Polychlorobiphényles: congénères PCB 28, PCB 52, PCB 77, PCB 81, PCB 101, PCB 118, PCB 126, PCB 138, PCB 153, PCB 156, PCB 169, PCB 180 et leur somme;
- composés organostanniques: tributylétain;
- pesticides organochlorés: Aldrine, Dieldrine, Endrine, alpha-HCH, beta-HCH, gamma-HCH (Lindane), DDD, DDT, DDE (pour chaque substance la somme des isomères 2.4 et 4.4), HCB, heptachlore et époxyde.

Les méthodologies utilisées pour rechercher les paramètres chimiques dans la matrice du biote sont rapportées ci-dessous.

MÉTAUX LOURDS

La minéralisation de l'échantillon est effectuée sur des aliquotes d'environ 0,3-0,4 grammes de substance préalablement séchée dans un four à 50 °C jusqu'à obtention d'un poids constant. Les tissus mous des moules sont ensuite pulvérisés dans un mortier et pesés à l'aide d'une balance d'une résolution d'un dixième de milligramme, directement dans le récipient en téflon où la minéralisation a lieu.

La méthode d'analyse implique une attaque avec 65% de HNO₃ ultrapur (5 mL), 30% de H₂O₂ (1 mL) et 2 mL d'eau ultrapure et une digestion à l'aide d'un système de micro-ondes fermé à basse pression programmé de manière appropriée.

Les analyses sont effectuées par spectrophotométrie d'émission optique (Varian Liberty AX Sequential ICP-OES 720).

Pour le mercure, l'analyse est effectuée par spectroscopie d'absorption atomique (USEPA 7471B (1998)) et par la méthode de la vapeur froide (dans le manuel Cetac M-7600).

La précision est vérifiée en utilisant le matériau de référence standard SRM NIST 2976 Mussel Tissue (National Institute of Standards & Technology, USA), qui a été traité de la même manière que les échantillons.

HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES

Afin de déterminer les 16 hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans la matrice du biote, définis comme des polluants prioritaires par l'agence américaine EPA (Environmental Protection Agency, US-EPA), nous procédons selon la méthode QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe).

Transférer 10 g de l'échantillon humide homogénéisé dans un tube à essai jetable de 50 ml, en ajoutant une tige de céramique pour briser les agglomérats et garder l'échantillon homogène. Ajouter ensuite 12 mL d'acétonitrile et placer le tube sur un agitateur horizontal pendant 15 minutes. Ajouter 6 g de MgSO₄ et 1,5 g de NaCl, agiter pendant 1 minute et centrifuger pendant 10 minutes à 5000 rpm.

Pour la procédure d'extraction en phase solide dispersive (d-SPE), transférez 4 mL du surnageant (acétonitrile) dans un tube jetable de 15 mL contenant 400 mg de PSA, 400 mg de

C18 bouché, 1200 mg de MgSO₄, agitez pendant 1 minute, et centrifugez pendant 10 minutes à 3200 rpm.

Environ 1,5 mL du surnageant purifié est filtré à travers des membranes PVDF d'une porosité de 0,45 µm et transféré dans des flacons en verre.

A ce stade, nous procédons à l'analyse instrumentale par chromatographie liquide à ultra-performance avec détecteur de fluorescence (UPLC/FLD Waters Acquity).

Le dosage est ensuite effectué en HPLC/FLD avec un étalonnage en cinq points de 0,1 ng/mL à 100 ng/mL (correspondant à 0,12 et 120 µg/kg pc dans l'échantillon de biote).

BIPHÉNYLES POLYCHLORÉS

La méthode de référence pour la détermination des PCBs est la méthode EPA 1668C (2010).

La méthode est basée sur l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse à haute résolution combinée à la spectrométrie à haute résolution (HRGC/HRMS) pour la séparation, l'identification et la quantification par dilution isotopique des PCB, elle est notamment appliquée à la détermination de 12 congénères de type dioxine (77, 81, 105, 114, 118, 123, 125, 156, 157, 167, 169, 189) et de 6 congénères de PCB indicateurs (28, 52, 101, 138, 153, 180) dans des matrices de nature diverse, y compris le biote.

La dilution isotopique est une technique qui consiste à calculer les congénères d'intérêt natif par rapport à leurs analogues marqués au C13.

La procédure d'analyse comporte plusieurs étapes : préparation de l'aliquote et ajout de standards marqués, extraction de la partie lipidique, purification, évaporation des extraits et transfert dans des flacons d'injection, analyse instrumentale.

L'analyse des échantillons est assortie d'un blanc de procédure qui doit suivre les mêmes procédures que celles auxquelles les échantillons sont soumis. Les résultats de la détermination du blanc sont utilisés pour corriger les mesures de l'échantillon ou pour détecter les erreurs dues à l'interférence des contaminants dans les réactifs.

La préparation consiste à lyophiliser l'échantillon avant l'extraction pour éliminer l'humidité et augmenter l'efficacité de l'extraction. Une partie aliquote de l'échantillon homogénéisé est

pesée, à laquelle est ajoutée une quantité connue de standard d'extraction contenant les congénères marqués et soumise à une lyophilisation.

L'échantillon lyophilisé est transféré dans une cellule d'extraction par solvant à l'aide de l'extracteur de solvant accéléré DIONEX (ASE200). L'extrait obtenu est filtré sur du sulfate de sodium anhydre dans un *rotavapor*, le solvant est concentré à quelques ml et ensuite porté à sec sous un flux d'azote pour le changement de solvant afin de poursuivre l'étape de purification.

La purification implique deux traitements : la destruction de la matrice organique/lipidique par une colonne multicouche, dont le composant principal est la célite imprégnée d'acide sulfurique concentré qui agit comme un agent qui "brûle" la matrice et la purification sur un système de colonnes de silice et d'alumine afin d'éliminer/séparer l'analyte d'intérêt des substances interférentes. Avant de commencer le traitement de purification, l'étalon de nettoyage marqué est ajouté à l'extrait, afin d'évaluer les pertes éventuelles d'analyte dans cette phase.

Dans la dernière étape, l'extrait purifié est microconcentré : après la purification, le solvant de l'échantillon est évaporé sur *rotavapor* jusqu'à quelques ml, transféré dans le flacon gc et porté à sec sous flux d'azote. Avant l'injection, le standard de la seringue est ajouté et l'échantillon est injecté dans le système HRGC/HRMS.

TRIBUTYLÉTAIN

La détermination du composé organostannique tributylétain dans le biote est effectuée par extraction assistée par micro-ondes et détermination ultérieure par HPLC-ICP-MS.

L'extraction assistée par micro-ondes, ou MAE (Microwave-Assisted Extraction), est une technique d'extraction rapide et efficace basée sur l'utilisation de micro-ondes pour chauffer le mélange échantillon/solvant afin de faciliter et d'accélérer l'extraction de l'analyte.

L'échantillon (environ 2,0 g), après séchage à l'air, est transféré dans des chemises d'extraction. A chaque échantillon sont ajoutés 10 mL d'une solution d'extraction (Acétate d'ammonium 0,5 M, Acide acétique 1 M, dans du Méthanol). Le programme micro-ondes implique une extraction à 100 °C pendant 5 minutes.

Après refroidissement, chaque échantillon est filtré dans des flacons de 10 mL. Cette opération est suivie d'une évaporation sous azote jusqu'à un volume de 2 mL (un volume plus petit entraîne une opacité de la solution). Les échantillons sont stockés à -20 °C. Avant l'analyse instrumentale, chaque échantillon est dilué par un facteur 2 avec de l'eau Milli-Q.

Pour la séparation des composés organostanniques, on utilise une HPLC de la série 200 de PerkinElmer, une colonne ultra-rapide C18 avec des particules de phase stationnaire de 1,9 µm de diamètre. Le tableau 1 présente les conditions analytiques requises pour effectuer les analyses.

Tab.1 - conditions analytiques pour la séparation des composés organostanniques

Colonne	Phase inverse	C-18
	Diamètre interne	2.1 mm
	Longueur	8 cm
	Diamètre des particules	1.9 µm
Éluant	Composition	Acétonitrile:Eau:Acide acétique 65:23:12 avec l'ajout de TEA à 0.1%
	Flux	0.3 mL/min
Injection	Volume	20 µL

L'étalonnage externe est utilisé comme méthode d'étalonnage, avec des solutions standard ayant des concentrations de 5, 10, 20, 40 et 50 µg/L. Les étalons sont préparés directement dans des flacons en verre d'une capacité de 1,5 ml.

Les échantillons et les standards sont dans une matrice de 50% d'eau et 50% de solvant. Un pourcentage plus élevé de solvant entraîne une instabilité importante du plasma.

La quantification de l'analyte est réalisée par spectrométrie ICP-MS (ELAN 9000 PerkinElmer), en utilisant les isotopes les plus abondants de l'étain : 118Sn et 120Sn. Un micronébuliseur PFA et une chambre de pulvérisation cyclonique refroidie à 2 °C sont utilisés pour minimiser la

quantité de solvant dans la torche ; l'utilisation d'oxygène post-colonne diminue la quantité de matière organique déposée à l'interface.

PESTICIDES ORGANOCHLORÉS

Le principe de la méthode repose sur l'extraction par solvant des pesticides chlorés des organismes marins, la purification ultérieure et la détermination par chromatographie en phase gazeuse.

L'analyse est effectuée à partir de 10 grammes d'échantillon décortiqué tel quel, sans aucun processus de lyophilisation, et procède selon la méthode QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe).

La méthode QuEChERS peut être divisée en deux parties : la première consiste en une homogénéisation et une extraction avec de l'acétonitrile ; la seconde consiste en des étapes de purification avec SPE dispersive (d-SPE, dispersive Solid Phase Extraction).

Nous procédons ensuite à l'analyse instrumentale réalisée avec le LC-MS/MS composé d'un analyseur triple quadripôle. La chromatographie de masse est réalisée à l'aide d'une colonne de 20 m de modèle TG-5 ms. L'instrument est équipé d'un TSQ Quantum Ultra fabriqué par Thermo.

Une norme de processus est également utilisée pour garantir le résultat.

ANALYSE DES BIOMARQUEURS CHEZ LES MOULES (Gorbi et al., 2008 ; Regoli et al., 2014).

Parmi les nombreux types de biomarqueurs qui peuvent être étudiés dans les moules, on peut citer:

- le cytochrome P450 comme indicateur de l'exposition aux contaminants organiques HAP, PCB, etc;
- Altérations de l'ADN dues à des mutagènes inorganiques ou à des xénobiotiques organiques;
- l'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) induite par les organophosphorés, les carbamines, le Cd, le Pb, le Cu, etc.;

- synthèse des métallothionéines dans le foie et d'autres tissus à la suite d'une exposition aux métaux lourds Zn, Cu, Cd, Hg, Fe, etc;
- stimulation des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion transférase) suite à l'exposition aux ROS, radicaux libres, peroxydation lipidique;
- la vitellogénine, dont la production est induite par des substances à activité œstrogénique (De Meo, 2011).

Pour le présent projet, il a été décidé d'évaluer comme sources de données les biomarqueurs suivants : métallothionéines, système de neurotoxicité (acétylcholinestérase), dommages à l'ADN (micronoyaux), système lysosomal, systèmes immunitaires, en plus des systèmes oxydants, prolifération peroxysomale.

Les niveaux de métallothionéines, protéines cytosoliques induites par l'exposition aux métaux lourds, sont évalués dans des glandes digestives homogénéisées (1:3 p/v) dans un tampon Tris-HCl 20 mM pH 8,6, avec 0,5 M de saccharose, 0,006 mM de leupeptine comme inhibiteur de protéase, 0,5 mM de phénylméthylsulfonylfluorure (PMSF) comme agent protéolytique, β -mercaptoéthanol 0,01% comme agent réducteur. Après centrifugation à 30 000 xg pendant 45 min à 4 °C, la purification des métallothionéines est effectuée par une série de précipitations à l'éthanol. Le culot obtenu par ces procédures et contenant les métallothionéines, est séché sous flux d'azote, remis en suspension dans une solution de NaCl 0,25 M et de HCl 1 N, contenant 4 mM d'EDTA pour éliminer les cations métalliques liés aux métallothionéines. À la solution résultante, on a ajouté un tampon Na-phosphate 200 mM pH 8, du NaCl 2 M et de l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) 0,43 mM et l'échantillon a ensuite été centrifugé à 3 000 xg pendant 5 min à 4°C. La concentration de métallothionéines est évaluée par rapport aux groupes -SH déterminés par spectrophotométrie à $\lambda = 412$ nm par réaction avec le DTNB. La quantification est effectuée au moyen d'une ligne d'étalonnage standard, avec des concentrations connues de GSH (50-500 μ M).

L'activité acétylcholinestérasique est mesurée dans l'hémolymphe convenablement centrifugée pendant 5 minutes à 3 000 xg. Le surnageant est utilisé pour déterminer l'activité acétylcholinestérasique (AChE) selon la méthode d'Ellman à une température de 18 ± 1 °C, à

une longueur d'onde de 412 nm, avec un coefficient d'extinction molaire (ϵ) de 13,6 mM⁻¹ cm⁻¹.

La stabilité des membranes lysosomales est mesurée dans les hémocytes circulant librement par analyse du temps de rétention du rouge neutre (NRRT). Après le prélèvement, on laisse les cellules adhérer pendant 15 minutes à 4°C dans une chambre humide. Les cellules sont ensuite incubées avec une solution de Rouge Neutre et examinées à intervalles de 15 minutes (jusqu'à une durée maximale de 120 minutes) pour déterminer le moment auquel 50% des hémocytes ont le Rouge Neutre qui n'est plus compartimenté dans les lysosomes mais libéré dans le cytosol. La solution mère de Neutral Red est préparée en dissolvant 28,8 mg de colorant dans 1 mL de diméthylsulfoxyde (DMSO) et conservée à 4 °C pendant 3 semaines maximum ; au moment de l'analyse, 10 μ L de la solution mère sont dilués dans 5 mL de solution saline.

Le rapport granulocytes/hyalinocytes est analysé sur des aliquotes d'hémolymphe correctement dispersés sur une lame. Après séchage, les cellules attachées sont fixées dans le Ca-formol de Baker (10 ml de formaldéhyde à 40% ; 1 g de CaCl₂, 2,5% NaCl, complété au volume avec de l'eau distillée). Après avoir été rincées, les lames sont colorées avec le colorant de Giemsa avant d'être montées dans de la gélatine glycinée. L'observation par microscopie optique (1000x) permet d'évaluer le nombre de granulocytes et de hyalinocytes, après avoir compté au moins 200 cellules pour chaque échantillon.

L'activité de phagocytose est analysée dans les cellules hémocytaires ; 100 μ L d'hémolymphe sont dispersés sur une lame et les cellules adhèrent pendant 15 minutes dans une chambre humide dans l'obscurité. Les bioparticules ZIMOSAN A marquées à la fluorescéine (Invitrogen Z2841) sont ajoutées dans un rapport d'environ 10:1 (bioparticules:hémocytes). Après deux heures d'incubation dans une chambre humide à l'obscurité, les particules non phagocytées sont éliminées par lavage dans du sérum physiologique et les lames sont fixées dans du Ca-formol de Baker et montées dans de la gélatine glycinée. L'activité de phagocytose est exprimée en pourcentage de cellules internalisant au moins 3 particules fluorescentes, après observation par microscopie à fluorescence d'au moins 200 cellules par échantillon.

L'analyse de l'accumulation de lipofuscine est réalisée sur des coupes cryostatiques de 8 μ m de glande digestive, fixées dans le Ca-formol de Baker pendant 15 minutes à 4 °C ; puis les lames

sont rincées dans de l'eau distillée et immergées pendant 5 minutes dans la solution de coloration constituée de chlorure ferrique à 1 % et de K-ferricyanide à 1 % (5:1) portée à un volume de 50 mL avec de l'eau distillée. Les lames sont ensuite lavées d'abord dans de l'acide acétique à 2% puis dans de l'eau distillée et enfin montées dans de la gélatine glycinée. Le logiciel d'analyse d'images Image Pro Plus 6.2 est utilisé pour déterminer l'intensité de la coloration des granules de lipofuscine, mis en évidence comme des granules de couleur bleu-vert dans les tubules de la glande digestive de la moule. L'accumulation de lipofuscine est exprimée en termes d'intensité de coloration par μm^2 de tissu total.

L'analyse de l'accumulation des lipides neutres est également réalisée sur des coupes cryostatiques de 8 μm d'épaisseur de la glande digestive qui subissent une étape de fixation dans du buffer-formol pendant 15 min à 4 °C, suivie d'un rinçage dans de l'alcool isopropylique à 60%. La procédure de coloration suivante comprend 15 minutes d'incubation dans une solution saturée de Oil Red O (1 % dans l'alcool isopropylique), un lavage d'une minute dans de l'alcool isopropylique à 60 % puis dans de l'eau distillée, et un montage dans de la gélatine glycinée. L'accumulation de lipides neutres est mesurée à l'aide du logiciel d'analyse d'image Image Pro Plus 6.2, et exprimée en termes d'intensité de fluorescence par μm^2 de tissu total.

Les dommages génotoxiques sont évalués dans l'hémolymphe des moules par l'analyse de la fréquence des micronoyaux. Une aliquote d'hémolymphe est prélevée dans le muscle adducteur, lavée dans un tampon salé (500 mM NaCl, 120 mM KCl, 20 mM HEPES, 10 mM EDTA) avec de courtes centrifugations. Les cellules sont ensuite traitées avec le fixateur de Carnoy (mélange 3:1 de méthanol et d'acide acétique) et soumises à de courtes centrifugations et à des changements de fixateur, avant de préparer des frottis sur des lames. Après coloration des préparations avec du chlorhydrate de 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) 100 ng/mL, les lames sont examinées au microscope à fluorescence pour déterminer le pourcentage de cellules contenant des micronoyaux. Au moins 2 000 cellules sont comptées pour chaque échantillon. Les micronoyaux sont considérés comme étant toutes les portions de chromatine fortement positives au DAPI qui sont physiquement discontinues avec le noyau central, de forme circulaire ou ovoïde, et entre 1/3 et 1/20ème du diamètre du noyau cellulaire.

L'analyse des systèmes enzymatiques antioxydants est réalisée sur des échantillons homogénéisés de glande digestive (1:5 p/v) dans un tampon K-phosphate 100 mM à pH 7,5, avec 2,5% de NaCl, 0,1 mM de PMSF (phénylméthylsulfonylfluorure) et des inhibiteurs de protéase : aprotinine 0,008 TIU/mL, leupeptine 1 µg/mL, pepstatine 0,5 µg/mL. Après centrifugation à 100 000 xg pendant 1 heure à 4°C, la fraction cytosolique est aliquotée et conservée à -80°C. Les activités enzymatiques des principaux systèmes antioxydants sont analysées par des tests spectrophotométriques à 18°C. L'activité de la catalase (CAT), un système antioxydant qui détoxifie le peroxyde d'hydrogène en catalysant sa transformation en eau et en oxygène, est évaluée en suivant la diminution de l'absorbance à $\lambda=240$ nm, $\epsilon=0,04$ mM⁻¹ cm⁻¹. Le test est effectué pendant une minute dans un volume final de 1 mL contenant un tampon K-phosphate 100 mM, pH 7, avec 12 mM H₂O₂ et des aliquotes appropriées d'échantillon. Les enzymes glutathion peroxydase (GPx) dépendantes et indépendantes du sel agissent contre les peroxydes organiques et inorganiques en les réduisant en alcools correspondants. L'activité enzymatique est mesurée en suivant l'action d'un système enzymatique couplé où le glutathion oxydé GSSG, formé dans la réaction catalysée par la peroxydase, est converti en forme réduite GSH par l'action de la glutathion réductase. Dans l'essai, la consommation de NADPH est suivie d'une diminution de l'absorbance à $\lambda=340$ nm, $\epsilon=6,22$ mM⁻¹ cm⁻¹. L'activité des formes d'enzymes Se-dépendantes et combinées Se-dépendantes et Se-indépendantes a été mesurée en utilisant le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) comme substrat, respectivement, pour tester l'efficacité de détoxification des enzymes sur les peroxydes inorganiques et l'hydroperoxyde de cumène (CuPx) pour évaluer son action sur les peroxydes organiques. La réaction est réalisée dans un volume final de 1 mL contenant un tampon K-phosphate 100 mM pH 7,5, 1 mM EDTA, 2 mM GSH, 0,24 mM NADPH, 0,5 mM H₂O₂ ou 0,8 mM CuPx, 1U GR et des aliquotes appropriées d'échantillon. La famille enzymatique des glutathion S-transférases (GST) catalyse les réactions de conjugaison entre différentes classes de molécules avec le glutathion réduit (GSH), diminuant leur réactivité ou les rendant plus hydrosolubles et donc éliminables par l'organisme. L'analyse est effectuée par dosage spectrophotométrique en suivant la tendance de l'absorbance du complexe formé par le GSH et le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) détecté à $\lambda=340$ nm, $\epsilon=9,6$ mM⁻¹ cm⁻¹. La réaction est

suivie pendant une minute dans un volume final de 1 mL contenant un tampon K-phosphate 100 mM pH 6,5, CDNB 1.5 mM, GSH 1 mM et des aliquotes appropriées d'échantillon. L'enzyme glutathion réductase (GR), responsable de la transformation du glutathion oxydé GSSG en forme réduite GSH à l'aide de NADPH, est dosée par analyse de la diminution de l'absorbance détectée à $\lambda=340$ nm, $\epsilon = -6,22$ mM⁻¹cm⁻¹, due à l'oxydation de NADPH. La réaction est réalisée dans un volume final d'essai de 1 mL contenant un tampon K-phosphate 100 mM pH 7, 1 mM GSSG, 0,12 mM NADPH et des aliquotes appropriées d'échantillon. Pour la détermination du glutathion total (GSH), les homogénats de la glande digestive sont préparés dans de l'acide sulfosalicylique à 5% avec de l'EDTA 4 mM (1:5 p/v). Les échantillons sont laissés sur la glace pendant 45 minutes pour la déprotéinisation, puis centrifugés à 37 000 xg pendant 15 minutes. Le glutathion total est déterminé dans le surnageant par mesure spectrophotométrique, à la longueur d'onde $\lambda=412$ nm, de l'intensité de la réaction entre les groupes -SH et DTNB. Le dosage est effectué dans un tampon K-phosphate 100 mM pH 7, EDTA 1 mM, DTNB 0,1 mM, NADPH 0,24 mM, glutathion réductase 1 U et des aliquotes appropriées d'échantillon. Les valeurs d'absorbance obtenues sont quantifiées à l'aide d'une courbe d'étalonnage standard à des concentrations connues de glutathion réduit. La capacité antioxydante totale est estimée par le test TOSC qui mesure l'efficacité globale d'un tissu biologique à neutraliser différentes formes de ROS, notamment les radicaux peroxydes (ROO⁻) et les radicaux hydroxyles (HO⁻). Les analyses sont effectuées sur le composant cytosolique d'échantillons de glandes digestives homogénéisés (1:5 p/v) dans un tampon de travail composé de tampon K-phosphate 50 mM pH 7,5, NaCl 2,5%. Les homogénats ainsi obtenus ont été centrifugés à 100 000 xg pendant 1 heure et 10 minutes à 4°C, et la fraction cytosolique subaliquotée et conservée à -80°C jusqu'à l'analyse. Le test TOSC-A (Total Oxyradical Scavenging Capacity Assay) implique la réaction entre les différentes formes de radicaux générés artificiellement et l'acide α -céto- γ -méthylbutyrique (KMBA), qui agit comme substrat et s'oxyde en libérant du gaz éthylène. La production d'éthylène est quantitativement diminuée en présence d'agents antioxydants (tels que ceux contenus dans le matériel biologique) qui réagissent avec les radicaux, les neutralisant et les retirant de la réaction avec le KMBA. Les radicaux peroxydes (ROO⁻) sont générés par l'homolyse thermique du 2,2'-azo-bis-amidinopropane (ABAP) tandis que les radicaux hydroxyles (HO⁻)

sont générés par la réaction de Fenton fer-ascorbate. Les réactions sont effectuées dans des flacons en verre spéciaux de 10 ml, scellés avec des bouchons à septum spéciaux et maintenus à une température constante de 35°C dans un bain thermostatique qui est continuellement agité pour permettre la génération constante des différentes formes de radicaux. Les conditions finales de l'essai sont les suivantes

- pour l'analyse des radicaux peroxydes (ROO-) : un volume variable d'échantillon, KMBA 0,2 mM et ABAP 20 mM dans un tampon K-phosphate 50 mM pH 7,4 ;
- pour l'analyse du radical hydroxyle (HO-) : volume variable d'échantillon, 0,2 mM KMBA, 1,8 µM Fe³⁺, 3,6 µM EDTA et 180 µM d'acide ascorbique dans un tampon K-phosphate 50 mM pH 7,4.

Le KMBA est oxydé par les différentes formes de radicaux générant du gaz éthylène. La formation d'éthylène est suivie dans le temps par analyse chromatographique en phase gazeuse sur une colonne capillaire "Supelco SPB-1" (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm) et par FID (Flame Ionization Detector), en utilisant les conditions instrumentales suivantes : température du four de 35°C, température du FID de 220°C, température d'injection de 160°C, débit d'hydrogène de 30 mL/minute ; débit d'hélium de 3 mL/minute. La différence de production d'éthylène entre la réaction dans les flacons témoins et la réaction dans les flacons contenant les échantillons est calculée mathématiquement en intégrant l'aire sous les courbes cinétiques respectives de production d'éthylène en fonction du temps, en considérant que chaque échantillon est lu toutes les 12 minutes pour une durée totale de dosage de 96 minutes. Les résultats obtenus permettent de quantifier le paramètre TOSC, entre 0 et 100, indice de la capacité globale de l'échantillon analysé, à neutraliser les différentes formes d'espèces réactives de l'oxygène. La valeur expérimentale du TOSC est obtenue selon la formule :

$$\text{TOSC} = 100 - (\int\text{SA} / \int\text{CA} \times 100)$$

où $\int\text{SA}$ et $\int\text{CA}$ sont les intégrales des surfaces sous les courbes représentant les réactions d'un échantillon SA (zone de l'échantillon), et du contrôle CA (zone de contrôle), respectivement.

Un échantillon dépourvu de toute capacité à neutraliser les radicaux présentera une production d'éthylène en fonction du temps égale à celle des témoins ($JSA / JCA=1$) et la valeur TOSC résultante sera donc égale à 0. Au contraire, une hypothétique valeur TOSC=100 correspondrait à un échantillon qui neutralise toutes les espèces réactives produites, inhibant complètement la formation d'éthylène pendant toute la durée du test ($JSA=0$). À partir des résultats expérimentaux, on obtient une valeur TOSC spécifique, liée à la teneur en protéines et exprimée en unités TOSC/mg de protéines.

Les protéines sont analysées selon la méthode de Lowry, en utilisant l'albumine de sérum bovin (BSA) comme standard.

La teneur en malondialdéhyde (MDA) est déterminée par une réaction de conjugaison avec le 1-méthyl-2-phénylindole, entraînant la formation d'un composé dont l'absorbance est détectable à la longueur d'onde $\lambda=586$ nm. Pour cette analyse, les échantillons de glande digestive de *M. galloprovincialis* sont homogénéisés dans du Tris-HCl 20 mM pH 7,4 (1:3 p/v) et centrifugés à 3 000 xg pendant 20 minutes. La réaction de conjugaison est conduite à 45 °C pendant 40 minutes dans un mélange réactionnel contenant du 1-méthyl-2-phénylindole 10,3 mM dans de l'acétonitrile dilué à un rapport de 3:1 avec du méthanol, HCl 37%. Après centrifugation à 15 000 xg pendant 10 minutes, la teneur en malondialdéhyde est mesurée par spectrophotométrie, en utilisant comme étalon le 1,1,3,3-tétraméthoxypropane dans du Tris-HCl 20 mM.

La prolifération peroxysomale, un biomarqueur spécifique de l'exposition aux proliférateurs peroxysomaux, est évaluée par spectrophotométrie en analysant l'activité enzymatique de l'acyl-CoA oxydase (ACOX), une enzyme localisée au niveau des peroxysomes et impliquée dans la bêta-oxydation des acides gras. Les échantillons de glandes digestives sont homogénéisés dans un tampon de bicarbonate de sodium 1 mM, pH 7,6, contenant 1 mM d'EDTA, 0,1% d'éthanol, 0,01% de TRITON X-100 et centrifugés à 500 xg pendant 15 min à 4°C. L'activité enzymatique de l'ACOX est déterminée en suivant la réaction d'oxydation du diacétate de dichlorofluorescéine (DCF-DA) en présence d'une peroxydase externe et avec l'ajout d'un substrat spécifique (Palmitoyl CoA) à une température de 25 ± 1 °C et $\lambda = 502$ nm.

4. Métaux

4.1 Contamination par les métaux-traces

Les métaux-traces sont des éléments présents dans tout environnement. Certaines activités humaines provoquent une augmentation significative de leurs concentrations, bien au-delà des valeurs naturelles dans l'eau de mer, ce que l'on appelle la contamination. L'environnement portuaire accueille diverses activités qui sont des sources importantes de contamination par des métaux traces, dont le cuivre. La toxicité connue de certains métaux traces, dont le cuivre, nécessite une surveillance de leur concentration pour évaluer l'impact des activités humaines sur le milieu marin.

Une série d'échantillons sera prélevée dans chacun des ports pilotes afin d'estimer la contamination par le cuivre, ses sources potentielles (principalement le port) et sa dispersion dans le milieu marin extérieur. Les échantillons d'eau seront prélevés à l'aide d'une bouteille horizontale de type Niskin préalablement lavée à l'acide et rincée à l'eau ultrapure. Sur chaque site d'échantillonnage, les paramètres physiques de l'écosystème seront mesurés par une sonde multi-paramètres (température, conductivité, salinité, oxygène dissous, pH, redox, turbidité, chlorophylle a). Une fois collecté, l'échantillon sera versé dans une bouteille en éthylène-propylène fluoré (FEP), un matériau inerte qui ne libère pas de métal, évitant ainsi la contamination de l'échantillon placé à l'intérieur. Plusieurs aliquotes seront prélevés pour mieux définir non seulement la teneur totale et les échantillons de cuivre dissous par ICP-MS, mais aussi pour mieux comprendre la dynamique de ce métal dans l'écosystème déterminé. En effet, un certain nombre de paramètres doivent être pris en compte si l'on veut comprendre les mécanismes de distribution de cet élément et des espèces que l'on va retrouver dans l'environnement, appelé spéciation (Fig. 1).

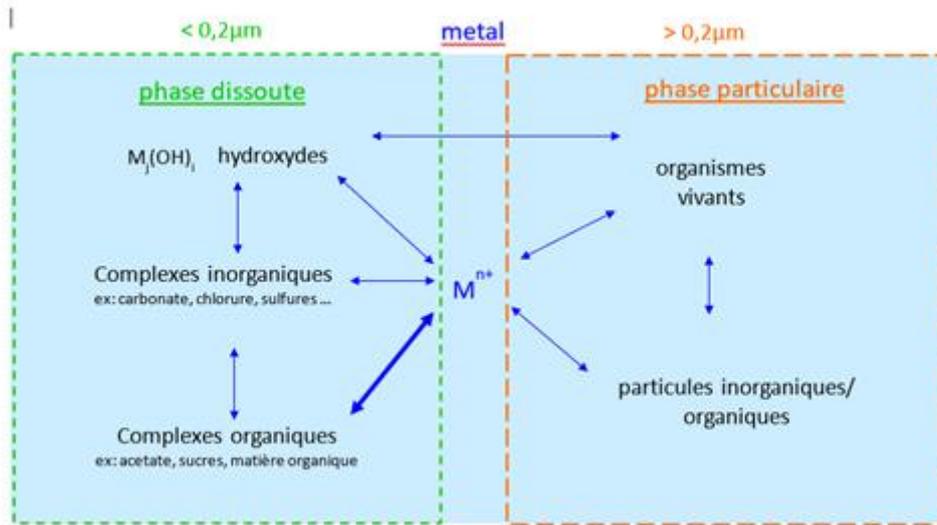


Fig. 1: Distribution d'un métal dans ses différentes espèces, ou spéciation.

La spéciation des métaux affecte leur toxicité. Cette spéciation est fortement influencée par la matière organique présente dans l'eau de mer. La teneur et la composition de la matière organique dans les échantillons seront analysées en mesurant la teneur en carbone organique dissous (TOC-VCSH) et en azote et soufre (mesure CHNS) (Fig. 2). L'origine et les fonctionnalités de la matière organique seront déterminées par une analyse de fluorescence.

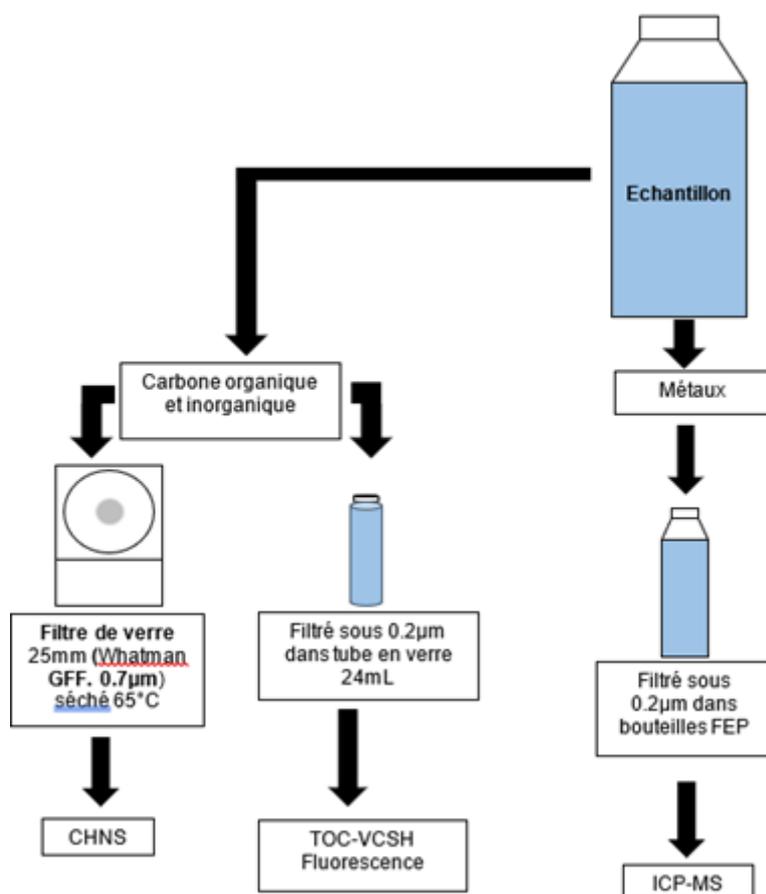


Fig. 2: Protocole analytique pour l'analyse chimique.

4.2 Les micro-organismes marins comme indicateurs de l'état du milieu

Les micro-organismes sont les organismes vivants les plus abondants dans le milieu marin (environ 10⁶ cellules/ml), ils représentent la majorité de la biomasse marine, assurent des fonctions uniques nécessaires au développement des ressources aquacoles que l'homme exploite et contribuent de manière significative aux services écosystémiques. En outre, les micro-organismes ont un temps de génération très court (de quelques dizaines de minutes à quelques dizaines d'heures), ce qui leur permet de réagir très rapidement aux changements de leur environnement. Constituées d'une seule cellule, leurs interactions avec les contaminants chimiques sont beaucoup plus directes que celles des macro-organismes multicellulaires. Enfin, les communautés microbiennes naturelles constituent un ensemble complexe d'espèces qui

sont sensibles et d'autres qui sont résistantes à la contamination chimique. Toutes ces caractéristiques en font de bons indicateurs de perturbations humaines. Leur étude nous permet de comprendre l'impact à court terme des activités humaines sur la biodiversité marine. Dans tous les ports pilotes, une caractérisation de l'abondance et de la diversité des communautés microbiennes dans l'eau de mer sera effectuée en parallèle avec chaque caractérisation chimique réalisée par l'UTLN. À partir de l'eau prélevée dans la bouteille Niskin pour l'analyse chimique, un petit volume est pré-filtré <math><40\ \mu\text{m}</math> pour éliminer les plus gros organismes avant l'analyse cytofluorimétrique. Les échantillons sont fixés au glutaraldéhyde sur le bateau pour arrêter l'évolution de l'échantillon, puis stockés dans de la glace sèche aussi rapidement que possible. Cette analyse permet de compter les procaryotes hétérotrophes (c'est-à-dire les bactéries et les archées) ainsi que de nombreux groupes de phytoplancton de très petite taille (pico- et nano-phytoplancton). Ces mesures rapides et simples peuvent mettre en évidence une production microbienne importante et examiner les relations de dominance entre les picocyanobactéries du genre *Synechococcus* (caractéristiques d'un environnement marin côtier non perturbé) et les picoeucaryotes photosynthétiques (caractéristiques d'un environnement plus riche en matières organiques et en bactéries).

Ces analyses par cytométrie en flux seront complétées par des analyses de biologie moléculaire permettant de quantifier plusieurs groupes de phytoplancton impossibles à différencier ou à détecter par cytométrie en flux dans un environnement portuaire riche en particules en suspension. Par conséquent, dans les premières heures suivant l'échantillonnage, 1,5 ml d'eau de mer de chaque site est centrifugé à 20 000 rpm pendant 20 minutes afin de recueillir les cellules microbiennes dans le culot. L'eau de mer est retirée et le culot cellulaire est immédiatement congelé sur glace sèche. De retour au laboratoire, l'ADN est extrait par lyse enzymatique et chimique (lysosime, SDS, protéinase K), puis purifié par précipitation avec de l'isopropanol et du Genelute. Plusieurs groupes phytoplanctoniques (*Prochlorococcus*, *Ostréococcus*, *Bathycoccus*, *Micromonas*) sont ensuite quantifiés par PCR quantitative dirigée vers un fragment de leur gène ARNr 16S ou 18S.

Enfin, sur environ la moitié des sites, des volumes d'eau plus importants sont utilisés pour une analyse plus approfondie de la diversité génétique de la communauté bactérienne afin

d'identifier plus précisément les groupes sélectionnés ou affectés par les activités humaines, dans le but d'identifier les processus naturels modifiés. Pour cela, dans les premières heures après l'échantillonnage, 1 L d'eau de mer est filtré sur 0,2 μm et le filtre est immédiatement congelé dans de la glace sèche. De retour au laboratoire, l'ADN est extrait comme décrit ci-dessus, les gènes procaryotes de l'ARNr 16S sont amplifiés et séquencés par des prestataires externes. Les séquences obtenues sont ensuite soumises à un traitement bioinformatique puis biostatistique pour analyser la diversité taxonomique et prédire la diversité fonctionnelle des communautés.

Ces différentes analyses seront interprétées à la lumière des données environnementales (analyses chimiques, données des sondes multi-paramètres, concentrations en nutriments) et entre les différents ports pilotes afin de comparer les influences respectives des différentes variables environnementales, y compris les perturbations portuaires anthropiques.

Bigliografie

- AAVV, 2001. Metodologie Analitiche di riferimento. Programma di monitoraggio per il controllo dell'ambiente marino-costiero (triennio 2001-2003). A.M. Cicero & I. Di Girolamo (Eds)" Ministero Ambiente e Tutela del Territorio-ICRAM-ANPA.
- Abdel-Moneim, A.M., Al-Kahtani, M.A., Elmenshawy, O.M., 2012. Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environments, Saudi Arabia. *Chemosphere*, 88: 1028-1035. DOI 10.1186/s40201-015-0222-y
- Abrahamson, A., 2007. Gill EROD activity in fish: a biomarker for waterborne Ah-receptor agonists. *Acta Universitatis Upsaliensis. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology* 311, 52 pp.
- Adams, S.M., Shorey, C.D., 1998. Energy dispersive spectroscopy of granular concretions in the mantle of the freshwater mussel *Hyridella depressa* from Lake Burragorang as a technique to monitoring metals in aquatic systems. *Aquatic. Toxicol.*, 44: 93-102.
- Andral, B., Stanisiere, J.Y., Sauzade, D., Damier, E., Thebault, H., Galgani, F., Boissery, P., 2004. Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Mar. Pollut. Bull.*, 49: 704 -712.
- Arockia Vasanthi, L., Revathi, P., Mini, J., Munuswamy, N., 2013. Integrated use of histological and ultrastructural biomarkers in *Mugil cephalus* for assessing heavy metal pollution in Ennore estuary, Chennai. *Chemosphere*, 91: 1156-1164.
- Au, D.W.T., 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Mar. Pollut. Bull.*, 48: 817-834. DOI 10.1016/j.marpolbul.2004.02.032.
- Ausili, A., Berducci, M.T., Maggi, C., Sesta, G., 2018. Analisi di sostanze prioritarie in matrici marine. Parte II. Idrocarburi policiclici aromatici e metalli ed elementi in traccia. ISPRA - Manuali e Linee Guida 176/2018. Roma, febbraio 2018.
- Ben Ameer, W., El Megdiche, Y., de Lapuente, J., Barhoumi, B., Trabelsi, S., Ennaceur, S., Camps, L., Serret, J., Ramos-López, D., Gonzalez-Linares, J., Touil, S., Ridha Driss, M., Borràs, M., 2015. Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in *Mugil cephalus* and *Dicentrarchus labrax* gill exposed to persistent pollutants. A field study in the

Bizerte Lagoon: Tunisia. Chemosphere, 135: 67-74. DOI
 10.1016/j.chemosphere.2015.02.050

- Beone, G.M., Ravera, O., 2003. Vantaggi e limiti del monitoraggio ambientale mediante l'analisi chimica dei Lamellibranchi. Studi Trent. Sci. Nat. Acta Biol., 80: 79-84.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. J. Fish. Dis., 22: 25-34. DOI
 10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x
- Bianchi, C.N., Morri, C., 2003. Indicatori biologici ed ecologici nell'ambiente marino. In: Ferretti O. (ed), Studi per la creazione di strumenti di gestione costiera: Golfo del Tigullio. ENEA, Centro Ricerche Ambiente Marino, La Spezia: 111-120.
- Bocca, B., Crebelli, R., Menichini, E., 2003. Presenza degli idrocarburi policiclici aromatici negli alimenti. Istituto Superiore di Sanità, Rapporti ISTISAN 03/22, pp. 45.
- Bryan, G.W., Langston W.J., 1992. Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special references to UK estuaries: a review. Environ. Pollut., 76: 89-131.
- Byrne, M., Vesk, P.A., 2000. Elemental composition of mantle tissue granules in *Hyridella depressa* (Unionida) from the Hawkesbury - Nepean River system, Australia: influence from catchment chemistry. Aust. J. Mar. Freshw. Res., 51: 183-192.
- CETAC M-7600 Mercury Analyzer Manual, https://www.environmental-expert.com/files/7782/download/456685/38-M7600_Op_Manual.pdf
- Ciborowski, J.J.H., Corkum, L.D. 1988. Organic contaminants in adult aquatic insects of the St. Clair and Detroit rivers, Ontario, Canada. J. Great Lakes Res., 14: 148-156.
- De Kock, W.C., Kramer, K.J.M., 1994. Active biomonitoring (ABM) by translocation of bivalve molluscs. In: K.J.M. Kramer (ed), Biomonitoring of coastal waters and estuaries. CRC Press Inc.: 51-84.
- De Meo, E., 2011. La vitellogenina in *Mytilus galloprovincialis* e la sua utilizzazione quale biomarcatore dello stato d'inquinamento del Golfo di Napoli. (Ph. D. tesi) Università Federico II, Napoli, Italia, 80 pp.

- El-Moselhy, K.M., Othman, A.I., Abd El-Azem, H., El-Metwally, M.E.A., 2014. Bioaccumulation of heavy metals in some tissues of fish in the Red Sea, Egypt. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1:, 97-105. DOI 10.1016/j.ejbas.2014.06.001
- Figueiredo-Fernandes, A., Ferreira-Cardoso, J.V., Garcia-Santos, S., Monteiro, S.M., Carrola, J., Matos, P., Fontainhas-Fernandes, A., 2007. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. *Pesqui. Vet. Bras.*, 27: 103–109. DOI 10.1590/S0100-736X2007000300004
- Fossi, M.C., 2000. Biomarkers. Strumenti di diagnosi e prognosi ambientale. Rosini Editrice: 134 pp.
- Fossi, M.C., 2001. Biomarkers: strumenti di diagnosi e prognosi ecotossicologica dell'ambiente marino costiero. *Biol. Mar. Medit.*, 8 (2): 146-154.
- Foulkes, E.C. (Ed.). 1982. Biological Roles of Metallothionein. Elsevier: 327 pp.
- Franzellitti, S., Buratti, S., Valbonesi, P., Capuzzo, A., Fabbri, E., 2011. The β -blocker propranolol affects cAMP-dependent signaling and induces the stress response in Mediterranean mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.*, 101(2): 299-308.
- Giari, L., Simoni, E., Manera, M., Dezfuli, B.S., 2008. Histo-cytological responses of *Dicentrarchus labrax* (L.) following mercury exposure. *Ecotox. Environ. Saf.*, 70: 400–410. DOI 10.1016/j.ecoenv.2007.08.013
- Giesy, J.P., Graney, R.L., Newsted, J.L., Rosiu, C.J., Benda, A., Kreis, R.G.Jr., Horvath, F.J., 1988. Comparison of three sediment bioassay methods using Detroit River sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 7: 483-498.
- Giesy, J.P., Hoke, R.A., 1989. Freshwater sediment toxicity bioassessment: rationale for species selection and test design. *J. Great Lakes Res.*, 15: 539-569.
- Girón-Pérez, M.I., 2010. Relationships between innate immunity in bivalve molluscs and environmental pollution. *IS J.*, 7: 149-156.
- Goldberg, E.D., 1975. The Mussel Watch. *Mar. Pollut. Bull.*, 6: 111-113.
- Gorbi, S., Regoli, F., 2004. Induction of cytochrome P4501A and biliary PAH metabolites in European eel *Anguilla anguilla*: seasonal, dose- and time-response variability in field and laboratory conditions. *Mar. Environ. Res.*, 58: 511–515.

- Gorbi, S., Virno Lamberti, C., Notti, A., Benedetti, M., Fattorini, D., Moltedo, G., Regoli, F., 2008. An ecotoxicological protocol with caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring the impact of an offshore platform in the Adriatic Sea. *Marine Environmental Research*, 65: 34-49.
- Gupta, S.K., Singh, J., 2011. Evaluation of mollusc as sensitive indicator of heavy metal pollution in aquatic system: a review. *IIOAB J.*, 2: 49-57.
- Jones, R.A., Lee, G.F., 1978. Evaluation of the elutriate test as a method of predicting contaminant release during open water disposal of dredged sediment and environmental impact of open water dredged material disposal. Volume I: Discussion. U.S. Army Corps of Engineers, Waterways Experiment Station, Vicksburg, MS. Technical Report D78-45.
- Klaverkamp, J.F., Dutton, M.C., Majewski, H.S., Hunt, R.V., Wesson, L.J., 1991. Evaluating the effectiveness of metal pollution controls in a smelter by using metallothionein and other biochemical responses. In: M.C. Newman and A.W. McIntosh (Eds.). *Metal Ecotoxicology. Concepts & Applications*. Lewis Publ.: 33-64.
- Lee, G.F., Jones, R.A., Saleh, F.Y., Mariani, G.M., Homer, D.H., Butler, S.S., Bandyopadhyay, P., 1978. Evaluation of the elutriate test as a method of predicting contaminant release during open water disposal of dredged sediment and environmental impact of open water dredged material disposal. Volume II: Data Report. U.S. Army Corps of Engineers, Waterways Experiment Station, Vicksburg, MS. Technical Report D78-45.
- Malins, D.C., Ostrander G.K. (Eds.), 1994. *Aquatic Toxicology. Molecular, biochemical and cellular perspectives*. Lewis Publ.: 539 pp.
- Malueg, K.W., Schuytema, G.S., Gakstatter, J.H., Krawczyk, D.F., 1983. Effect of *Hexagenia* on *Daphnia* response in sediment toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2: 73-82.
- Martin-Diaz, M.L., Franzellitti, S., Buratti, S., Valbonesi, P., Capuzzo, A., Fabbri, E., 2009. Effects of environmental concentrations of the antiepileptic drug carbamazepine on biomarkers and cAMP-mediated cell signaling in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.*, 94: 177-185.
- Mitchell, S.O., Baxter, E.J., Holland, C., Rodger, H.D., 2012. Development of a novel histopathological gill scoring protocol for assessment of gill health during a longitudinal

- study in marine-farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquacult. Int.*, 20: 813–825. DOI 10.1007/s10499-012-9504-x
- Munawar, M., Hänninen, O., Roy, S., Munawar, N., Kärenlampi L., Brown, D., 1995. Bioindicators of environmental health. SBP Academic Publ.: 265 pp.
- Murtala, B.A., Abdul, W.O., Akinyemi, A.A., 2012. Bioaccumulation of heavy metals in fish (*Hydrocynus forskahlii*, *Hyperopisus bebe occidentalis* and *Clarias gariepinus*) organs in downstream Ogun coastal water, Nigeria. *J. Agr. Sci.*, 4: 51–59. DOI 10.5539/jas.v4n11p51
- Nebeker, A.V., McCrady, J.K., Shar, R.M., McAuliffe, C.K., 1983. Relative sensitivity of *Daphnia magna*, rainbow trout and fathead minnows to endosulfan. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2: 69–72.
- O' Connor, T.O., Cantillo, A.Y., Lauenstein, G.G., 1994. Monitoring of temporal trends in chemical contamination by the NOAA National Status and Trends Mussel Watch Project. In: K.J.M. Kramer (ed), *Biomonitoring of coastal waters and estuaries*, CRC Press Inc.: 29-50.
- Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville M.P., 2006. Biomarkers of exposure and reproduction-related effects in mussels exposed to endocrine disruptors. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 50: 361–369.
- Phillips, D.J.H., Segar, D.A., 1986. Use of bio-indicators in monitoring conservative contaminants: programme design imperatives. *Mar. Pollut. Bull.*, 1: 10-17.
- Pojana, G., Gomiero, A., Jonkers, N., Marcomini, A., 2007. Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. *Environ. Int.*, 33: 929–936.
- Poleksić, V., Lenhardt, M., Jaric, I., Djordjevic, D., Gacic, Z., Cvijanovic, G., Raskovic, B., 2010. Liver, gills, and skin histopathology and heavy metal content of the Danube sterlet (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758). *Environ. Toxicol. Chem.*, 29: 515– 521. DOI: 10.1002/etc.82
- Pretti, C., Cognetti-Varriale, A.M., 2001. The use of biomarkers in aquatic biomonitoring: the example of esterases. *Aquat. Conserv.*, 11: 299–303. DOI 10.1002/aqc.457
- Ravera, O., 2001. Monitoring of the aquatic environment by species accumulator of pollutants: a review. *J. Limnol.*, 60: 63–78. DOI 10.4081/jlimnol.2001.s1.63

- Regoli, F., Pellegrini, D., Cicero, A.M., Nigro, M., Benedetti, M., Gorbi, S., Fattorini, D., D'Errico, G., Di Carlo, M., Nardi, A., Gaion, A., Scuderi, A., Giuliani, S., Romanelli, G., Berto, D., Trabucco, B., Guidi, P., Bernardeschi, M., Scarcelli, V., Frenzilli, G., 2014. A multidisciplinary weight of evidence approach for environmental risk assessment at the Costa Concordia wreck: Integrative indices from Mussel Watch. *Mar. Environ. Res.*, 96: 92-104.
- Richardson, N., Gordon, A.K., Muller, W.J., Pletschke, B.I., Whitfield, A.K., 2010. The use of liver histopathology, lipid peroxidation and acetylcholinesterase assays as biomarkers of contaminant-induced stress in the Cape stumpnose, *Rhabdosargus holubi* (Teleostei: Sparidae), from selected South African estuaries. *Water SA*, 36: 407-416.
- Sandulli, R., 2004. Il ruolo degli indicatori biologici nella valutazione dello stato dell'ambiente marino. *Biol. Mar. Medit.*, 11 (2): 185-192.
- Scarpato, A., Giordano, P., Calabretta, E., Romanelli, G., Amici, M., Amato, E., Cicero, A.M., 2006. Sviluppo di una rete di sorveglianza della qualità delle acque marino-costiere del Mediterraneo nordoccidentale attraverso l'uso di bioindicatori (Mussel Watch attivo): approccio metodologico e risultati preliminari. *Biol. Mar. Medit.*, 13 (1): 423-433.
- Schloesser, D.W. 1988. Zonation of mayfly nymphs and caddisfly larvae in the St. Marys River. *J. Great Lakes Res.*, 14: 227-233.
- Suares Rocha, P., Luiz Luvizotto, G., Kosmehl, T., Böttcher, M., Storch, V., Braunbeck, T., Hollert, H., 2009. Sediment genotoxicity in the Tietê River (São Paulo, Brazil): In vitro comet assay versus in situ micronucleus assay studies. *Ecotox. Environ. Safe.*, 72: 1842-1848. DOI 10.1016/j.ecoenv.2009.04.013
- USEPA, 1998. Method 7471B (SW846): Mercury in solid or semisolid waste (Cold-Vapor Technique). Washington, DC.
- USEPA, 2010. Method 1668C Chlorinated biphenyl congeners in water, soil, sediment, biosolids, and tissue by HRGC/HRMS. Washington DC.
- Van Dyk, J.C., Cochrane, M.J., Wagenaar, G.M., 2012. Liver histopathology of the sharptooth catfish *Clarias gariepinus* as a biomarker of aquatic pollution. *Chemosphere*, 87: 301-311. DOI 10.1016/j.chemosphere.2011.12.002

- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, F., 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.*, 146(3): 281-300.
- Wang, W.-X., Fisher, N.S., 1999. Delineating metal accumulation pathways for aquatic invertebrates. *Sci. Total Environ.*, 237/238: 459-472.
- Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., Jiang, G., 2008. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Anal. Chim. Acta*, 606: 135-150. DOI 10.1016/j.aca.2007.11.018