

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 - MITILI

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

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 - Mitili	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. La méthodologie appliquée aux moules est détaillée dans ce produit.

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. Nel dettaglio di questo prodotto è riportata la metodologia applicata ai mitili.

Index

1 Introduction	1
2. Les moules comme bioindicateurs	2
2.1 Méthodologie d'enquête à appliquer aux moules.....	5
Bibliographie	19

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 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.

2.1 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: Acénaphylène, Benzo(a)anthracène, Fluoranthène, Naphtalène, Anthracène, Benzo(a)pyrène, Benzo(b)fluoranthène, Benzo(k)fluoranthène, Benzo(g,h,i)pérylène, Acénaphène, 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 µL 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 hématocytaires ; 100 µL 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:hématocytes). 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 µm 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 µm² 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pepstatine 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 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 $\lambda=240\text{ nm}$, $\epsilon=0,04$



Interreg



UNION EUROPÉENNE
UNIONE EUROPEA



MARITTIMO-IT FR-MARITIME

Fonds européen de développement régional
Fondo Europeo di Sviluppo Regionale

Produit n. T2.2.2

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⁻¹ cm⁻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

[La cooperazione al cuore del Mediterraneo](#)
[La coopération au coeur de la Méditerranée](#)

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 :

$$\text{TOSC} = 100 - (\text{JSA} / \text{JCA} \times 100)$$

où JSA et JCA 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.

Bigliografie

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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., 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.
- Munawar, M., Hänninen, O., Roy, S., Munawar, N., Kärenlampi L., Brown, D., 1995. Bioindicators of environmental health. SBP Academic Publ.: 265 pp.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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