

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 - PESCI

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

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 - Pesci	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. Dans le détail de ce produit, on retrouve la méthodologie appliquée aux poissons.

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 pesci.



Interreg



UNION EUROPEENNE
UNIONE EUROPEA



MARITTIMO-IT FR-MARITIME

Fonds européen de développement régional
Fondo Europeo di Sviluppo Regionale

Produit n. T2.2.2

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
Bigliographie	15

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).

Bigliografia

- 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.
- 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.
- 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
- 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
- Bocca, B., Crebelli, R., Menichini, E., 2003. Presenza degli idrocarburi policiclici aromatici negli alimenti. Istituto Superiore di Sanità, Rapporti ISTISAN 03/22, pp. 45.
- 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.
- 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
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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
- 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.
- 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
- 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.
- Schloesser, D.W. 1988. Zonation of mayfly nymphs and caddisfly larvae in the St. Marys River. *J. Great Lakes Res.*, 14: 227–233.
- Suarez 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

- 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
- 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