

DEL/04, BREST

**DIRECTION DE L'ENVIRONNEMENT  
ET DE L'AMENAGEMENT LITTORAL**

**L'ECOTOXICOLOGIE APPLIQUEE  
AU MILIEU MARIN**

*par Manuelle MAURICE*



**R.INT.DEL/96.11/NANTES**

**IFREMER Bibliotheque de BREST**



0EL07261



CENTRE de NANTES

Rue de l'île d'Yeu  
B.P. 1049 - 44037 NANTES cedex 01 - France  
Tel. 40 37 40 00 - Fax 40 37 40 01 - Télex 711 196

NANTES, le 17 décembre 1996

N. Réf. : 119 DEL/EX - MM/MJT

## NOTE

de Manuelle MAURICE  
DEL/EX  
NANTES

à Destinataires *in fine*

Conformément à la note DEL/QM/PM/FBon. n° 96.90 du 3 décembre 1996, je vous adresse un exemplaire (deux pour les bibliothèques) du rapport que j'ai rédigé : "L'écotoxicologie appliquée au milieu marin". Référence R.INT.DEL/96.11/NANTES.

Manuelle MAURICE

### DESTINATAIRES :

- Directeur Scientifique,
- Directeurs opérationnels DEL, DRV
- Directeur de la Communication
- Directeurs de Centres : Toulon, Brest, Boulogne et Nantes
- Bibliothèques : Brest, Nantes et Boulogne (2 ex.)
- Directeur Adjoint (Brest)
- Chefs de Services QM, QR (Nantes), AA (Brest)
- Chefs des laboratoires côtiers : Boulogne, Port-en-Bessin, Saint-Malo, Concarneau, La Trinité, Nantes, L'Houmeau, La Tremblade, Arcachon, Toulon, Sète, Corse
- Chefs de Laboratoires : DEL/MCN (Brest), DEL/HS (Brest), DEL/EC (Brest), DEL/EX (Nantes), DEL/CCM (Toulon), DEL/MIC (Brest), DEL/PN (Nantes)
- Documentaliste DEL de Brest
- Secrétaire du Comité de Lecture

**DIRECTION DE L'ENVIRONNEMENT  
ET DE L'AMENAGEMENT LITTORAL**

**L'ECOTOXICOLOGIE APPLIQUEE**

**AU MILIEU MARIN**

*par Manuelle MAURICE*

*R.INT.DEL/96.11/NANTES*

## FICHE DOCUMENTAIRE

<b>Type de rapport : RST</b>	
<b>Numéro d'identification du rapport : DIR/SER/Typdoc/An-Num</b> R.INT.DEL/96.11/NANTES <b>Diffusion :</b> libre <input checked="" type="checkbox"/> restreinte <input type="checkbox"/> interdite <input type="checkbox"/> <b>Validé par :</b>  <b>Adresse électronique :</b> - chemin UNIX :  - adresse WWW :	<b>date de publication</b>  <b>nombre de pages : 104</b>  <b>bibliographie (Oui / Non)</b>  <b>illustration(s) (Oui / Non)</b>  <b>langue du rapport : Français</b>
<b>Titre et sous-titre du rapport :</b>  <p style="text-align: center;">L'écotoxicologie appliquée au milieu marin</p> <b>Titre traduit :</b>	
<b>Auteur(s) principal(aux) : nom, prénom</b>  <p style="text-align: center;">Manuelle MAURICE</p>	<b>Organisme / Direction / Service, laboratoire</b>  <p style="text-align: center;">IFREMER/DEL/Écotoxicologie</p>
<b>Collaborateur(s) : nom, prénom</b>	<b>Organisme / Direction / Service, laboratoire</b>
<b>Organisme commanditaire : nom développé, sigle, adresse</b>	
<b>Titre du contrat :</b>	<b>n° de contrat Ifremer</b>
<b>Organisme(s) réalisateur(s) : nom(s) développé(s), sigle(s), adresse(s)</b>  <b>Responsable scientifique :</b>	
<b>Cadre de la recherche :</b> Programme : <span style="margin-left: 200px;">Convention :</span>  Projet : <span style="margin-left: 100px;">Autres (préciser) :</span>  Campagne océanographique : (nom de campagne, année, nom du navire)	

## FICHE DOCUMENTAIRE

### Résumé :

Ce rapport vise à faire le point sur les grandes orientations prises jusqu'à aujourd'hui en écotoxicologie marine en France et dans le monde. Il aborde successivement l'état de l'environnement en France, la toxicité des polluants chimiques vis-à-vis des organismes marins, le monitoring des polluants et la mise en pratique de la biosurveillance. Il décrit notamment les différentes techniques utilisées pour l'évaluation de l'impact des polluants chimiques sur les écosystèmes marins.

### Abstract :

In this report we present the main scientific orientations taken until now in France and under the world concerning marine ecotoxicology. We discuss successively the state of the environment in France, the toxicity of pollutants on marine organisms, the monitoring of pollutants and the technics used to measure the biological effects on marine ecosystems.

### Mots-clés :

Ecotoxicologie marine, polluants chimiques, écosystèmes, effets biologiques, bio-surveillance.

### Keywords :

Marine ecotoxicology, chemicals, ecosystems, biological effects, bio-monitoring.

### Commentaire :

**Ce rapport n'a pas pour objet de décrire de façon exhaustive l'ensemble des travaux menés en écotoxicologie marine en France et hors frontières, il se veut plutôt être un document de synthèse donnant les grandes orientations prises jusqu'à aujourd'hui par les chercheurs chargés de la mise au point de techniques d'évaluation de la toxicité des polluants, en particulier chimiques, sur les organismes marins. Il peut servir de base de réflexion à l'élaboration d'une stratégie future qui tiendrait compte des acquis et intégrerait l'évolution récente de nos connaissances en biologie, plus particulièrement en biologie moléculaire.**

Merci à Marie-Jo Thébaud pour le soin apporté à la frappe de ce document.

## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>5</b>
<b>L'ETAT DE L'ENVIRONNEMENT EN FRANCE .....</b>	<b>6</b>
<b>I – Les mécanismes de dispersion et de circulation des polluants .....</b>	<b>6</b>
<b>II – La qualité de l'air .....</b>	<b>8</b>
<b>III – La qualité du sol .....</b>	<b>9</b>
<b>IV – La qualité des eaux .....</b>	<b>9</b>
1 – Les eaux continentales .....	9
2 – Les eaux marines et le littoral .....	9
2-1 – La contamination microbienne .....	10
2-2 – La contamination chimique .....	10
<b>V – Le bilan de la contamination chimique en France .....</b>	<b>12</b>
<b>LA TOXICITE DES POLLUANTS CHIMIQUES VIS-A-VIS DES ORGANISMES MARINS .....</b>	<b>14</b>
<b>I – Le transfert trophique des composés chimiques .....</b>	<b>14</b>
<b>II – L'influence des propriétés physico-chimiques des composés toxiques         sur la vitesse et l'importance de l'absorption .....</b>	<b>15</b>
<b>III – La métabolisation des composés chimiques .....</b>	<b>15</b>
1 – La biotransformation des HAP et des PCB par les animaux marins .....	17
2 – La cancérogénèse chez le poisson .....	18
2-1 – La cancérogénèse expérimentale chez le poisson .....	18
2-2 – Les lésions néoplasiques et les tumeurs observées in situ .....	20
<b>LA SURVEILLANCE DES POLLUANTS .....</b>	<b>22</b>
<b>I – La surveillance chimique ou le dosage des polluants dans la matière         vivante in situ .....</b>	<b>22</b>
1 – Les bivalves .....	23
2 – Les poissons .....	23
<b>II – La surveillance biologique ou la prévision des effets .....</b>	<b>24</b>
1 – Les tests d'écotoxicité ou l'écotoxicologie expérimentale .....	28
1-1 – Nouveaux tests d'écotoxicité en milieu aquatique .....	32
1-2 – Les constantes mesurées .....	33
2 – La recherche de biomarqueurs (physiologiques, biochimiques, génétiques) .....	34
2-1 – Les marqueurs physiologiques et biochimiques non spécifiques .....	35

2-1-1 – La croissance .....	35
2-1-2 – L'activité énergétique .....	36
<i>L'énergie métabolique</i> .....	36
<i>Les réserves énergétiques</i> .....	36
<i>Les enzymes du métabolisme énergétique</i> .....	36
<i>L'énergie de croissance et de reproduction</i> .....	36
2-1-3 – L'activité endocrine .....	37
2-1-4 – La réponse immunitaire .....	37
2-1-5 – La fonction de détoxification (phase II) .....	40
2-1-6 – La réponse à l'oxydation .....	42
2-1-7 – Les protéines et les enzymes constitutives .....	42
<i>Les protéines biomarqueurs de stress</i> .....	42
<i>La Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> – ATPase</i> .....	45
2-1-8 – La chimie du sang .....	46
2-2 – Les marqueurs biochimiques spécifiques .....	46
2-2-1 – Le système enzymatique de détoxification MFO .....	46
<i>Les monooxygénases à flavine</i> .....	48
<i>Les cytochromes P450</i> .....	48
2-2-2 – L'acétylcholinestérase .....	61
2-2-3 – L'acide $\delta$ -aminolévulinique deshydratase ( $\Delta$ -ALAD) .....	61
2-2-4 – Les métallothionéines .....	62
2-3 – Les marqueurs de génotoxicité .....	62
2-3-1 – Les aberrations chromosomiques .....	63
2-3-2 – Les adduits à l'ADN .....	64
<i>Le rôle des adduits dans le processus de cancérogénèse</i> .....	64
2-3-3 – Inhibition de la méthylation de l'ADN .....	66
2-3-4 – Les mutations .....	66
<i>Les oncogènes chez les poissons</i> .....	68
<i>Les gènes suppresseurs de tumeurs chez les poissons</i> .....	72
<b>LA MISE EN PRATIQUE DE LA BIOSURVEILLANCE</b> .....	73
<b>I – Les travaux du RNO</b> .....	73
1– La surveillance des polluants .....	73
2– La surveillance des effets biologiques .....	74
<b>CONCLUSION</b> .....	79
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	81



## **INTRODUCTION**

La pollution de la biosphère constitue une menace dont l'impact sur l'état de l'environnement s'accroît à une échelle de plus en plus étendue, voire globale. La connaissance scientifique des modalités de pollution de la biosphère, celle de ses effets, non seulement sur les êtres vivants isolés, mais sur les systèmes écologiques en tant que tels, est un préalable catégorique si l'on veut assurer la qualité et la pérennité des écosystèmes terrestres et aquatiques. Cela a conduit les scientifiques, dès la fin des années soixante, à développer une nouvelle discipline, l'écotoxicologie.

Prise au sens strict, l'écotoxicologie peut être définie comme la science dont l'objet est l'étude des polluants toxiques dans les divers écosystèmes continentaux et marins, même ceux les plus reculés et donc apparemment les moins marqués par l'action de l'homme (Ramade, 1992; Moriarty, 1983). Elle a pour objet de préciser :

- les modalités et mécanismes de la contamination des divers écosystèmes par les principales catégories de polluants toxiques ;
- leur circulation et leurs transformations biogéochimiques dans ces derniers ;
- leurs effets biocoenotiques ainsi que les perturbations qu'ils induisent dans les processus écologiques fondamentaux en particulier dans ceux qui assurent la productivité biologique des écosystèmes et de la biosphère.

Parallèlement à l'écotoxicologie, la toxicologie de l'environnement étudie la toxicité des composés présents dans l'environnement envers l'homme et les animaux. Elle s'intéresse essentiellement aux modalités par lesquelles des polluants exercent une action toxique sur les organismes-cibles, principalement les mammifères, et aux mécanismes de cette action aux plans cellulaires et moléculaires.

## **L'ETAT DE L'ENVIRONNEMENT EN FRANCE**

L'Institut Français de l'Environnement (IFEN) qui est, depuis 1994, le correspondant national de l'Agence Européenne de l'Environnement (AEE) à Copenhague, a dressé un bilan très récent de l'état de l'environnement en France (IFEN, 1994-1995). Il existe désormais un consensus pour considérer que le champ de l'environnement inclut au moins trois aspects fondamentaux : la qualité des milieux (eau, air, sol), la préservation de ces milieux contre les diverses formes de pollution et la protection de la nature.

Les principales causes de contamination de l'écosphère dans la civilisation industrielle aujourd'hui sont :

- la production de l'énergie,
- les activités de l'industrie chimique,
- les activités agricoles.

En France, on constate une certaine réduction des pollutions émises chaque année (notamment, les émissions industrielles dans l'eau ou dans l'air). Cependant, cette amélioration n'évite pas une érosion continue de la qualité des milieux ou des écosystèmes qui, en raison de phénomènes cumulatifs, évoluent globalement vers une certaine médiocrité. L'importance de ces phénomènes apparaît avec une évidence plus grande : produits chimiques ou métaux lourds sédimentés dans les sols ou les nappes phréatiques, déchets stockés dans des sites mal répertoriés, espaces gelés par l'urbanisation et les infrastructures, réduction très progressive de la diversité des espèces, chlorofluorocarbures (CFC) ou gaz à effet de serre s'accumulant encore plus lentement dans la haute atmosphère.

### **I – Les mécanismes de dispersion et de circulation des polluants**

Ramade a proposé en 1989 une classification des polluants qui peuvent être répartis en 3 grandes classes en fonction de leur nature : les polluants physiques, les polluants chimiques et les polluants biologiques (Tableau 1).

Tableau 1 : Classification des polluants (d'après Ramade, 1989)

Nature des polluants	Compartiment ou Ecosystèmes			
	Atmosphérique	Continentaux	Limiques	Marins
<b>1) Polluants physiques :</b>				
Radiations ionisantes	+	+	+	+
Pollution thermique	+	+	+	+
<b>2) Polluants chimiques :</b>				
Hydrocarbures	+	+	+	+
Plastiques	+	+	+	+
Pesticides	+	+	+	+
Détergents		+	+	+
Composés divers de synthèse	+	+	+	+
Dérivés du Soufre	+	+	+	
Nitrates, Phosphates		+	+	+
Métaux lourds	+	+	+	+
Fluorures	+	+		
Particules minérales	+	+		
<b>3) Polluants biologiques :</b>				
Matières organiques mortes			+	+
Microorganismes	+	+	+	+

Les polluants sont libérés dans l'atmosphère, les sols, les eaux continentales et les océans. Ils sont soumis au même titre que les substances naturelles au jeu des phénomènes biogéochimiques. Les transformations dues à des facteurs physico-chimiques et (ou) biologiques auxquels ils sont exposés dans ces milieux variés peuvent certes les neutraliser mais aussi faciliter au contraire leur dispersion et exalter leur toxicité.

Les polluants qui sont présents dans l'atmosphère ne séjournent pas *ad infinitum* dans l'air. Les précipitations et les mécanismes de dépôt sec des particules les ramènent à la surface du sol et (ou) dans l'hydrosphère. Les particules solides sont entraînées mécaniquement ou par dissolution, les substances gazeuses sont également dissoutes dans les eaux pluviales. Les polluants circulent ensuite à la surface des continents, cheminant dans les sols et contaminant les eaux superficielles et les nappes phréatiques. En outre, le jeu du lessivage et de l'érosion hydrique intervient de façon essentielle dans le transfert des polluants des sols vers l'hydrosphère. En définitive, tôt ou tard, les phénomènes géochimiques vont avoir pour conséquence d'amener la masse des polluants émis par l'homme dans l'océan mondial qui constitue en définitive l'ultime réceptacle des agents toxiques et autres contaminants produits par la civilisation technologique.

Le premier exemple démontrant le transport de composés chimiques polluants à l'échelle planétaire fut la découverte d'une contamination par le DDT des neiges qui tombent dans les zones centrales de l'inlandsis antarctique (Peterle, 1969).

Les effets des polluants sur les populations résultent de leur toxicité aiguë ou à long terme. Ils se manifesteront par une mort immédiate ou différée si la concentration atteinte dans l'environnement est assez élevée. La mortalité par intoxication aiguë ou subaiguë, même si elle ne constitue pas le plus important risque écotoxicologique, demeure néanmoins une cause non négligeable de régression pour divers peuplements végétaux ou animaux. Face à ces problèmes, la France s'est dotée, depuis le début du siècle, de dispositions législatives, administratives et techniques, notamment dans le domaine de la qualité de l'eau et de l'air. Depuis une vingtaine d'années, la Communauté Européenne a pris une série de directives dans ce domaine. Enfin, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) propose des valeurs indicatives qui servent à établir les normes réglementaires.

## **II - La qualité de l'air**

La lutte contre la pollution de l'air s'engage au début des années 60. Elle vise à améliorer la qualité de l'air dans les zones les plus polluées, industrielles ou à forte concentration urbaine. A la fin des années 70 émergent les problèmes liés aux pollutions à grande distance notamment l'acidification des eaux lacustres et les dépérissements forestiers mais aussi la pollution photochimique. En 1992, les niveaux moyens de dioxyde de soufre ont légèrement baissé en France tandis que la pollution par le plomb se stabilisait après les reculs spectaculaires des années précédentes. L'augmentation notable des valeurs de pointe de concentration en oxydes d'azote met en évidence une pollution chronique d'origine automobile. La pollution photochimique, par l'ozone troposphérique notamment, prend des proportions inquiétantes. La France est le pays européen qui a le plus réduit ses émissions de gaz carbonique depuis 1980. Le niveau français d'émissions par habitant est aujourd'hui considérablement plus faible que celui des pays industrialisés comparables. Ces résultats sont dus au programme électronucléaire, aux évolutions de structure de l'économie et aux efforts de maîtrise de l'énergie, essentiellement dans les secteurs de l'industrie et dans le résidentiel-tertiaire. En revanche, les émissions du secteur des transports continuent à augmenter de manière importante, ce qui pourrait rendre difficile le respect de nos engagements internationaux.

### **III – La qualité du sol**

Le sol est tout à la fois un important réservoir génétique et un milieu dynamique d'équilibre entre les différents processus de développement et de dégradation. A côté de ses fonctions biologiques et d'alimentation des plantes, ses rôles de filtre et de tampon, de réservoir et de transfert, ainsi que de support mécanique et de matériau sont essentiels. C'est un milieu fragile soumis à divers types de risques et de dégradations physiques, chimiques ou biologiques plus ou moins réversibles et qui interagissent entre eux. La pollution des sols peut provenir des retombées atmosphériques, de l'utilisation des pesticides, de l'épandage de matières fertilisantes ou de l'épandage de boues de curage des cours d'eau. En France, les principaux déséquilibres chimiques identifiés sont : l'acidification, la modification des capacités d'échange et la variation de la teneur en minéraux des sols (comme les phosphates).

### **IV – La qualité des eaux**

#### **1– Les eaux continentales**

La qualité des eaux continentales telle qu'elle ressort des différentes évaluations, n'est pas satisfaisante. Les secteurs de pollution les plus importants ont régressé, en raison des travaux d'épuration des eaux domestiques et industrielles, et dans certaines régions par suite de la cessation d'activités industrielles très polluantes. L'état des grands cours d'eau s'améliore lentement et les objectifs de qualité tendent à être respectés pour la moitié des bassins versants. Une tendance inquiétante, perceptible sur les petites rivières mais aussi à l'échelle des bassins versants est la raréfaction des rivières de très bonne qualité. De nouvelles formes de pollution se font jour : pollution diffuse, eutrophisation, effet des micropolluants métalliques et organiques. L'ensemble des aménagements (travaux, régulation hydraulique, colonisation des berges, etc...) est certainement un des facteurs majeurs de cette dégradation insidieuse.

#### **2– Les eaux marines et le littoral**

La succession des marées noires, liées au déversement accidentel de pétrole en mer et le spectacle des déchets jonchant les côtes ont alerté les opinions publiques. Les divers apports polluants chroniques provenant des villes, des fleuves, des activités agricoles, des industries littorales et des rejets des navires peuvent affecter la qualité générale des eaux littorales par des enrichissements en éléments nutritifs, par l'introduction de substances chimiques toxiques (métaux lourds, polluants organiques) et de micro-organismes pathogènes (microbes, bactéries, virus) (Joanny, 1993). Depuis quelques années, on assiste également à la

multiplication des apparitions d'eaux colorées (abondance d'organismes phytoplanctoniques toxiques ou non) le long du littoral. La qualité des eaux littorales fait l'objet d'une surveillance permanente, à travers l'existence de différents réseaux d'observation mis en oeuvre par l'IFREMER : le Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin (RNO) pour la qualité générale des masses d'eau et la contamination du milieu par les métaux lourds et les composés organiques toxiques ; le REseau de surveillance du PHYtoplancton (REPHY) pour le suivi de l'apparition des algues phytoplanctoniques toxiques ; le REseau de surveillance Microbiologique (REMI) des zones conchylicoles pour la contamination du milieu par les bactéries d'origine terrestre.

### 2-1 – La contamination microbienne

Une mauvaise qualité des eaux peut provoquer l'infection bactérienne des mollusques et des poissons dans les zones d'élevage. Les agents pathogènes pour l'homme rencontrés dans les eaux marines sont des entérobactéries provenant de l'homme lui-même et des animaux d'élevage. Les plus connues sont les colibacilles (*Escherichia coli*) qui représentent environ 90 % des bactéries fécales et, les salmonelles, les plus dangereuses, qui peuvent provoquer soit des fièvres paratyphoïdes soit des toxi-infections alimentaires. Il est également possible de retrouver des virus pathogènes pour l'homme dans des coquillages filtreurs (cas de l'hépatite A). Les apports des micro-organismes pathogènes dans le milieu marin sont essentiellement dus aux rejets ponctuels des stations d'épuration et aux apports diffus par les eaux de ruissellement dans les régions d'élevage intensif.

### 2-2 – La contamination chimique

Cette contamination peut être due à la présence de métaux lourds ou de composés organiques toxiques.

#### – Le plomb

De tous les métaux lourds et autres éléments toxiques contaminant la biosphère, le plomb constitue actuellement, au même titre que le cadmium ou l'arsenic et devant le mercure, le plus préoccupant de ces polluants. La principale cause de pollution par le plomb tient, à l'heure actuelle, en son usage comme antidétonant dans les carburants automobiles, sous forme d'alkylplomb. La combustion des carburants renfermant du plomb tétraéthyle produit en effet des particules de ce métal qui passent dans l'atmosphère. A cela doivent être ajoutées les quantités libérées involontairement dans l'environnement par les combustions, la métallurgie et autres activités industrielles.

– Le mercure

Les biocoenoses aquatiques sont particulièrement exposées aux phénomènes de pollution par le mercure et de bioamplification de cet élément. Cela résulte de la grande complexité des réseaux trophiques propres aux milieux limniques et marins ainsi que de leur plus grand nombre de niveaux trophiques que dans les communautés terrestres.

– Le cadmium

Le cadmium est utilisé pour le traitement de surface et dans la fabrication de peintures et de piles. Mais c'est surtout au titre de sous-produit de l'exploitation du minerai de zinc qu'il se trouve en quantité importante dans l'estuaire de la Gironde jusqu'à son embouchure et un peu au-delà.

– Les PCBs

Les polychlorobiphényles sont des huiles chimiques de synthèse d'une très grande stabilité. Ils sont utilisés dans l'industrie comme agents diélectriques (pyralène des transformateurs et condensateurs), fluides hydrauliques, fluides caloporteurs, adjuvants dans les lubrifiants, peintures, encres. L'utilisation des PCB est à présent strictement réglementée.

– Le DDT

Le DDT (Dichloro Diphenyl Trichloroéthane) est un insecticide organique chloré de synthèse dont l'efficacité et le faible coût ont largement répandu l'utilisation depuis 1940. Mais sa rémanence et sa toxicité ont conduit à une restriction d'utilisation en de nombreux pays à partir de 1970.

– le  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane ( $\gamma$ -HCH ou lindane)

Parmi les isomères de l'hexachlorocyclohexane (HCH), seul l'isomère gamma possède une activité insecticide. Le lindane est un insecticide chloré largement utilisé, notamment contre les termites. L' $\alpha$ -HCH, isomère alpha de l'HCH, est un composé chloré de synthèse qui n'a pas d'activité insecticide. Normalement, il ne doit pas apparaître pour plus de 1 % dans la formulation du lindane.

### – Les HAP

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques constituent un groupe de composés résultant de la fusion de cycles benzéniques. Le plus simple des HAP est le naphthalène ( $C_{10}H_8$ ), résultant de la fusion de deux cycles benzéniques et le plus complexe le Coronène ( $C_{24}H_{12}$ ). Les HAP sont principalement issus de la combustion incomplète de la matière organique récente ou fossile (pétrole, charbon) dont sont responsables l'activité industrielle et le trafic automobile. Bien que les HAP ne possèdent pas une forte toxicité aiguë pour les homéothermes, ils constituent une classe de polluants dangereux car beaucoup d'entre eux sont de puissants cancérigènes. La présence de substituants alkyles sur leur molécule augmente leur cancérogénicité et leur halogénéation accroît leur toxicité aiguë pour les espèces animales.

## V – Le bilan de la contamination chimique en France

Replacé dans un contexte mondial, le littoral français apparaît relativement peu contaminé dans son ensemble. Cependant, plusieurs sites présentent des niveaux anormalement élevés pour un ou plusieurs contaminants. Les deux problèmes majeurs sont la contamination de l'estuaire de la Seine par les polychlorobiphényles (PCB) et celle de la Gironde par le cadmium.

L'estuaire de la Seine montre des teneurs particulièrement élevées en PCB dans les coquillages\* (1800 à 5000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ainsi que dans les poissons plats qui sont contaminés (Abarnou, 1993; Loizeau, 1993). La pollution de la baie de Seine par les PCB avait été mise en évidence dès 1980 par dosage de ces composés dans les mollusques marins (Thibaud et Alzieu, 1980). Le flux de PCB en Seine a été estimé par Marchand *et al* (1990) pour les années 80 à environ 0,35 tonnes/an. Cossa *et al* (1994) ont récemment identifié et dosé 5 congénères des PCB dans le cadre d'une étude pilote sur les apports en contaminants de la Seine. D'autres niveaux de contaminations forts sont observés localement (entre 600 et 1200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en rade de Lorient, estuaire de la Loire, Saint-Jean-de-Luz, Hendaye, débouché du petit Rhône, et rade de Toulon. Sur l'ensemble du littoral, les concentrations en PCB semblent décroître légèrement ou rester stables.

Le DDT insecticide chloré, est interdit en France depuis 1972. Les concentrations en résidus de DDT les plus importantes (250 à 450  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) sont relevées dans le bassin d'Arcachon et en Languedoc-Roussillon. Les tendances sont à la baisse.

---

\* Toutes les concentrations des contaminants dans les coquillages et les poissons sont exprimées par rapport au poids sec.



Les apports continus dans le milieu marin de tributylétain (TBT) par l'intermédiaire des peintures antisalissures ont été à l'origine de perturbations graves dans la reproduction et la croissance de mollusques marins, notamment les huîtres du bassin d'Arcachon. Il suffit de quelques nanogrammes par litre ( $10^{-9}$  g/l) de TBT dans l'eau pour provoquer la formation de chambres dans les huîtres, ce qui fragilise leur coquille et limite leur croissance. La France a été l'un des premiers pays à réglementer l'usage de ces peintures antisalissures à base d'organostanniques, notamment par l'arrêté du 19 janvier 1982 et le décret du 2 octobre 1992 qui interdisent l'emploi de ces peintures pour la protection des coques de bateaux de moins de 25 mètres. Les mesures de TBT dans les eaux à partir de 1985 montrent que les niveaux de concentration sont en général inférieurs à 5 ng/l dans les zones conchylicoles de l'Atlantique et de la Méditerranée, et entre 10 et 150 ng/l dans les ports de plaisance de l'Atlantique.

L'agriculture est de loin le plus important consommateur de produits phytosanitaires. Quelque 450 matières actives différentes sont utilisées pour les traitements phytosanitaires. Seul le lindane, insecticide chloré toujours utilisé, fait l'objet d'une surveillance systématique. Les triazines, les urées substituées et les composés organophosphorés font à présent l'objet d'études. Les premiers travaux réalisés indiquent la présence d'herbicides, de la famille des triazines, dans le delta du Rhône à des concentrations non négligeables (10 à 400 ng/l) (Tronczynski *et al*, 1993, 1994; Munsch, 1995) ainsi que dans la Seine (Tronczynski, 1995).

## LA TOXICITE DES POLLUANTS CHIMIQUES VIS-A-VIS DES ORGANISMES MARINS

La durée de vie d'un composé xénobiotique chez un animal est déterminée par l'équilibre entre différents processus physiologique : l'absorption, le stockage, le métabolisme et l'élimination. Ceci peut conduire à des phénomènes de bioaccumulation et de persistance de composés chimiques dans les organismes. Pour les composés hydrophobes lipophiles, la distribution dans les différents organes s'effectue en fonction de la teneur en lipides des différents tissus.

### I- Le transfert trophique des composés chimiques

Les composés chimiques dissous ou en suspension dans l'eau peuvent pénétrer les organismes animaux par les ouïes, la peau ou au travers du tractus gastro-intestinal. Les composés présents dans les sédiments peuvent être absorbés par contact dermique direct ou ingestion, ceux présents dans les plantes et les animaux des premiers niveaux trophiques sont généralement absorbés par ingestion. Des composés chimiques insolubles dans l'eau peuvent se retrouver solubilisés dans la matière organique (colloïdes, particules, sédiments) en suspension dans l'eau. L'efficacité de l'absorption intestinale pour les composés toxiques lipophiles est supérieure à 50 % chez de nombreuses espèces aquatiques et montre que l'assimilation par la voie nutritionnelle est particulièrement importante (Tanabe *et al*, 1982; Bruggeman *et al*, 1984; Niimi, 1986).

La capacité que peuvent avoir les composés xénobiotiques à traverser la membrane intestinale et à pénétrer la circulation systémique joue un rôle crucial dans l'assimilation. Le mécanisme de transport des toxiques à travers les entérocytes de la bordure en brosse et de la membrane basale est mal connu, il est généralement admis que le mouvement des composés lipo-solubles s'effectue par diffusion (Schanker *et al*, 1958; Thomson & Dietschy, 1981; Kuksis, 1984). Cependant d'autres mécanismes d'absorption ont été identifiés dans l'intestin tels que le transport actif, la pinocytose et la filtration. Le transport actif intervient dans le processus normal d'absorption de nombreux nutriments tels que les sucres, les acides aminés, les électrolytes et les acides biliaires. Il a été montré qu'il s'exerçait une compétition entre les composés toxiques et les nutriments de structure similaire pour l'interaction avec les transporteurs. La pinocytose est un mécanisme de transport qui permet l'absorption de macromolécules en particulier les antigènes au premiers stades de la vie chez les mammifères. L'importance de la filtration ou le transport paracellulaire des toxiques est encore mal appréciée, il apparaît cependant que la taille et la charge des toxiques sont déterminantes pour le mouvement transmembranaire à travers les pores et les jonctions intercellulaires.

## **II – L'influence des propriétés physico-chimiques des composés toxiques sur la vitesse et l'importance de l'absorption**

Les propriétés physicochimiques d'un composé xénobiotique telles que la lipophilie, l'hydrophilie, la présence de groupements acides ou basiques et le pKa, la taille de la molécule, vont influencer le phénomène d'absorption à partir du tractus gastro-intestinal. La diffusion passive étant le processus d'absorption majeur pour les composés non ionisés et les paires d'ions, la solubilité de ceux-ci dans l'eau et les lipides est primordiale. Les molécules hydrosolubles et légèrement liposolubles sont normalement le mieux absorbées, car leur solubilité dans l'eau augmente la surface d'échange avec les cellules intestinales et leur solubilité dans les lipides suffit à assurer la diffusion passive à travers les membranes des cellules intestinales jusqu'au sang. Les molécules peu hydrosolubles mais hautement liposolubles vont présenter de grandes variabilités dans l'absorption en fonction de paramètres tels que la matrice dans laquelle le composé chimique se trouve ingéré et la physiologie de l'animal. Les molécules à la fois peu hydrosolubles et peu liposolubles sont normalement peu absorbées, sauf si elles se trouvent dispersées au sein de matrices solubilisantes ou si elles possèdent des groupements acides ou basiques capables de former des sels solubles ou des paires d'ions.

## **III- La métabolisation des composés chimiques**

Les voies métaboliques qui prennent en charge la biotransformation des composés xénobiotiques comprennent un grand nombre d'enzymes différentes qui agissent sur divers types de substrat. Les plus connues de ces enzymes sont listées dans le Tableau 2. La plupart ont en commun la capacité de modifier la structure des composés xénobiotiques en les rendant à la fois moins toxiques et plus hydrosolubles ce qui leur permet d'être excrétés plus rapidement. Cependant, il est parfaitement acquis désormais que certains métabolites issus de cette biotransformation sont eux-mêmes plus réactifs et plus toxiques que le composé parent avant métabolisation. De nombreux composés chimiques toxiques et cancérigènes sont ainsi activés via le métabolisme. Ce type de métabolites réactifs se forme le plus souvent lors des réactions enzymatiques séquentielles participant aux phases d'activation, de détoxification et d'excrétion du xénobiotique. Williams (1959) a proposé le concept des réactions de phase I (oxydation et fonctionnalisation) et des réactions de phase II (conjugaison et détoxification) qui distingue ces deux phases essentielles dans le processus de biotransformation.

**Tableau 2 : Enzymes impliquées dans la biotransformation des composés xénobiotiques**  
(d'après Stegeman and Hahn, 1994)

---

Acétyltransacétylase
Alcool déshydrogénases
Aldéhyde déshydrogénases
Aldéhyde oxydase
D-Amino acide oxydase
Carbonyl réductase
Catalase
Cystéine-conjuguée N-acétyltransférase
Cytochromes P450
Dihydrodiol déshydrogénase
Epoxyde hydrolase
Estérases/amidases
Flavine monooxygénases
Glutathion peroxydase
Glutathion réductase
Glutathion transférases
Méthyltransférases
Monoamine oxydase
Prostaglandine synthétase-hydroperoxydase
Quinone réductase
Rhodanase
Sulfotransférases
Superoxyde dismutase
Thiol transférase
UDP-glucuronosyl transférases
Xanthine oxydase

---

Chez les poissons et les mammifères marins comme chez les mammifères terrestres, le foie contient la plus forte teneur en enzymes de biotransformation. En effet, le foie est, chez la plupart des animaux, le site majeur de biotransformation des polluants qui pénètrent l'organisme par les différentes voies d'absorption possibles. D'excellentes synthèses ont été publiées concernant le métabolisme des xénobiotiques chez les espèces aquatiques, tant vertébrés qu'invertébrés (Adamson, 1967; Chambers and Yarbrough, 1976; Bend and James, 1978; Lech *et al*, 1982; Stegeman, 1987, 1989; James, 1989; Livingstone *et al*, 1989; Livingstone, 1991; Goksoyr and Forlin, 1992; Andersson and Forlin, 1992).

Chez les poissons, les enzymes de biotransformation les plus importantes que sont les cytochromes P450, les UDP-glucuronosyl transférases, les sulfotransférases et les glutathion S-transférases existent, comme chez les mammifères, sous différentes isoformes dont le degré d'inducibilité et la spécificité de substrat varient (Foureman *et al*, 1987; George & Buchanan, 1990; Miranda *et al*, 1990; Clarke *et al*, 1992).

## **1- La biotransformation des HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques) et des PCB (polychlorobiphényles) par les animaux marins**

Dans les écosystèmes marins, les HAP et les PCB sont biodisponibles pour les poissons et les invertébrés (mollusques notamment) non seulement à partir de l'eau et des matières en suspension dans l'eau mais également à partir du sédiment. Ainsi il a été établi une forte corrélation chez le poisson : entre la teneur en HAP du sédiment et la concentration en composés aromatiques dans la bile, et, entre les teneurs en PCB, DDT et autres hydrocarbures chlorés du sédiment et leurs concentrations dans le foie et le contenu stomacal (Livingstone *et al*, 1992).

Les HAP s'accumulent chez les invertébrés marins mais, pas chez les poissons, car, chez ceux-ci ils sont métabolisés par le système enzymatique de détoxification MFO (Multi Fonction Oxydase system), plus précisément par les cytochromes P450 de la famille 1A qu'ils peuvent induire, et sont donc rapidement biotransformés. La plupart des études d'induction qui ont été menées sur des espèces aquatiques ont utilisé l'exposition par dissolution dans l'eau ou injection de l'agent inducteur et ont montré que les cytochromes P4501A homologues de nombreuses espèces de poissons sont extrêmement sensibles à l'induction par les composés de la famille des HAP (Stegeman, 1981). Les études au cours desquelles les composés de type HAP ont été administrés dans la nourriture ont montré en outre que les P4501A intestinaux et hépatiques étaient inductibles par voie nutritionnelle (Van Veld, 1990). Cependant, la biotransformation des HAP par les cytochromes P450 peut conduire, via des métabolites réactifs, à la formation d'adduits par fixation covalente aux macromolécules biologiques cellulaires telles que l'ADN, l'ARN ou les protéines. Ceci peut constituer une première étape vers un processus de cancérogenèse (Miller and Miller, 1977). Ainsi les poissons qui vivent dans des eaux polluées par les HAP ou des composés chimiques apparentés sont souvent porteurs de lésions néoplasiques ou de tumeurs de l'appareil gastro-intestinal, incluant la bouche, le foie et le canal biliaire (Myers *et al*, 1991; Black & Baumann, 1991). De nombreuses études ont montré la corrélation entre la présence de composés cancérogènes dans l'eau et les sédiments, les adduits à l'ADN dans le foie, et l'incidence des tumeurs chez le poisson (Reichert & Varanasi, 1987; Dunn *et al*, 1987; Dunn, 1991).

Les PCB et certains composés organochlorés sont, quant à eux, très lentement ou pas métabolisés par les animaux marins ce qui provoque leur accumulation aux différents niveaux trophiques des écosystèmes progressant du zooplancton, via les invertébrés et les poissons jusqu'aux prédateurs finaux, les mammifères marins. On sait par ailleurs que, s'ils sont peu métabolisés, ce sont de forts inducteurs des cytochromes P450 de la famille 1A ce qui laisse

envisager une synergie d'action et donc d'effets entre les deux types de contaminants que sont les HAP et les PCB dans les écosystèmes marins.

## **2- La cancérogenèse chez le poisson**

### **2-1 - La cancérogenèse expérimentale chez le poisson**

De nombreux composés chimiques à action cancérogène directe ou indirecte ont été testés sur des espèces de poissons acclimatables en aquarium. Les tests de cancérogénicité ont récemment fait l'objet d'une revue de synthèse par Metcalfe (1989). Le Tableau 3 liste quelques-uns des composés chimiques dont la cancérogénicité a été démontrée sur 10 espèces de poissons différentes et donne le nom des organes affectés.

Parmi les composés hépatocancérogènes on peut citer l'aflatoxine, les dérivés nitroso et azo, les HAP et les amines aromatiques. La cancérogénicité de l'aflatoxine et de la diethylnitrosamine avait été démontrée chez le poisson dès les années 60 (Ashley *et al*, 1964; Stanton, 1965). En effet, des tumeurs du foie chez la truite Arc en Ciel (*Oncorhynchus mykiss*) avaient été provoquées par une nourriture contaminée par l'aflatoxine dans les écloseries aux Etats-Unis (Halver, 1967; Sinnhuber, 1967; Sinnhuber *et al*, 1968). L'étude de la toxicité de l'aflatoxine chez les salmonidés, ainsi que l'étude des tumeurs du foie et les expériences d'induction chez les poissons d'eau douce constituent les principales avancées réalisées en biologie des tumeurs du foie chez le poisson dans les années 60. Les études d'hépatotoxicité ont été poursuivies dans les années qui ont suivi (Gingerich, 1982; Dalich & Larson, 1985; Droy *et al*, 1989).

En contre-partie, le rôle que peuvent jouer les PCB, les pesticides chlorés et d'autres agents non génotoxiques comme promoteurs dans le processus d'hépatocancérogenèse chez le poisson a été moins étudié.

**Tableau 3 : Cancérogénicité de 7 composés chimiques et d'un sédiment contaminé sur 10 espèces de poissons (d'après Moore & Myers, 1994)**

Espèce	DEN	MNNG	MAM	BHA	DMBA	BAP	AFB	SED
Danio	H H, EP							
Medaka	H H+	G M	H H+		H+	H		
<i>Rivulus marmoratus</i>	H		H+	H				
Guppy	H, EP H		H+ P		H+	H		
Truite Arc en ciel (Rainbow trout)	H	H, NB H+			H	H	H	H
Vairon à tête plate (Fathead minnow)			H+					
Malachigan (Sheepshead minnow)	H		H+					
Fondule (Gulf killifish)		P	H+					
Prêtre (Inland silverside)			H+					
<i>Poeciliopsis</i> spp.	H				H			

Note : H = foie ; H+ = foie et autres organes ; P = pancréas ; G = ouïe ; E = oeil ; EP = papilloma oesophageal ; M = melanome ; HP = hemangiopericytome ; NB = nephroblastome  
 DEN : diethylnitrosamine, MNNG : N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MAM : methylazoxyméthanol acétate, BHA : butylhydroxyanisole, DMBA : 7,12-diméthylbenz(a)antracène, BAP : benzo[a]pyrène, AFB : aflatoxine B<sub>1</sub>, SED : sédiment contaminé

## 2-2 – Les lésions néoplasiques et les tumeurs observées in situ

Les lésions néoplasiques ont été classées en 2 grandes catégories, en fonction de leur lien ou pas avec l'exposition à un polluant :

1- lésion non associée à l'exposition à un polluant.

Ces lésions incluent les néoplasmes des cellules pigmentaires, du tissu conjonctif et des gonades ;

2- lésion associée à l'exposition à un polluant.

Ces lésions incluent les néoplasmes épithéliaux du foie, du pancréas et de l'appareil gastrointestinal.

En ce qui concerne les lésions néoplasiques du foie, le diagnostic histologique a été basé sur les descriptions précédentes des lésions effectuées chez le rat et la souris (Stewart *et al*, 1980; Frith & Ward, 1980).

La première lésion néoplasique du foie chez les poissons sauvages a été observée par Dawe *et al* en 1964. Depuis le nombre de tumeurs détectées chez les espèces sauvages n'a cessé d'augmenter, en particulier les tumeurs du foie chez les espèces benthiques qui vivent en contact avec le sédiment (Harshbarger & Clark, 1990).

Les principales espèces chez lesquelles des lésions néoplasiques du foie ont été mises en évidence au niveau mondial sont :

– pour les espèces d'eau douce :

. le meunier noir (*Catostomus commersoni*) et le poisson-chat (*Ictalurus nebulosus*) (Black, 1988; Hayes *et al*, 1990a; Baumann *et al*, 1987; 1991)

– pour les espèces marines :

. la myxine (*Myxine glutinosa*, poisson marin au corps anguilliforme, classe des Agnathes) (Falkmer *et al*, 1976, 1977)

. le poulamon atlantique (*Microgadus tomcod*) (Cormier *et al*, 1989; Smith *et al*, 1979)

. la sole (*Parophrys vetulus*) (Myers *et al*, 1987, 1990, 1991; Becker, 1987)

. la plie rouge (*Pseudopleuronectes americanus*) (Murchelano & Wolke, 1985, 1991; Gardner *et al*, 1988, 1989; Moore, 1991; Johnson *et al*, 1993)

. le tambour (*Genyonemus americanus*) (Myers *et al*, 1991)

. la limande (*Limanda limanda*)



(Kranz & Dethlefsen, 1990)  
. le fondule (*Fundulus hereroclitus*)  
(Vogelbein *et al*, 1990).

Des articles de synthèse concernant ces néoplasmes ont été publiés durant les 30 dernières années (Wellings, 1968; Sonstegard & Leatherland, 1984; Mix, 1986; Harshbarger & Clark, 1990; Vethaak & Reinallt, 1992) ainsi que des compte rendus de symposium (Kraybill *et al*, 1977; Metcalfe, 1990).

Chez le poisson-chat (brown bullhead), la sole (English sole), la plie rouge (winter flounder) et le tambour (white croaker), l'incidence des néoplasmes hépatiques augmente significativement avec l'âge du poisson (Baumann *et al*, 1990; Landolt *et al*, 1985; Rhodes *et al*, 1987; Hinton *et al*, 1988; Myers *et al*, 1994). En effet, les facteurs tels que l'absorption répétée de xénobiotiques, la bioaccumulation de ceux-ci dans les lipides physiologiques, ainsi que l'augmentation de la teneur en adduits xénobiotique-ADN au cours du temps, favorisent l'apparition de lésions pré-tumorales (Varanasi *et al*, 1986, 1989a). Une liste récente des poissons osseux et cartilagineux chez lesquels des tumeurs du foie ont été observées fait état de 74 espèces (Hinton, 1994). Parmi celles-ci on peut citer le poulamon atlantique (*Microgadus tomcod*) dans l'estuaire de la rivière Hudson (Smith *et al*, 1979; Cormier, 1986), et la sole (English sole, *Pleuronectes vetulus*) dans l'estuaire de la rivière Duwamish aux Etats-Unis (Pierce *et al*, 1978).

## LA SURVEILLANCE DES POLLUANTS

L'étude de la pollution de l'environnement implique une connaissance aussi précise que possible de la distribution des polluants dans les écosystèmes et de leur effets sur les organismes vivants. Il est parfois d'usage de faire une distinction entre d'une part monitoring chimique dont l'objet est de déterminer le niveau de contamination par tel ou tel polluant des biotopes et de la biomasse et de l'autre monitoring biologique dont l'objet est d'évaluer l'impact à un instant donné ou en fonction du temps de la pollution de l'environnement sur les populations et les communautés exposées.

Le niveau critique de relation concentration – réponse écotoxicologique à un polluant donné étant connu, il sera ultérieurement possible d'établir des normes de protection de l'environnement pour le polluant considéré. Celles-ci fixeront :

1. les concentrations maximales tolérables dans les populations des espèces les plus sensibles et les espèces clef de l'écosystème
2. les concentrations maximales admissibles dans le biotope et dans le réseau trophique en aval des espèces de référence
3. un niveau maximum de rejet au site des sources d'émission du polluant pour s'assurer que les normes de qualité de l'environnement définies par (1) et (2) ne soient pas dépassées.

### **I- La surveillance chimique ou le dosage des polluants dans la matière vivante in situ**

La plupart des polluants, en particulier les substances persistantes – qu'elles soient organiques ou minérales – se présentent à des concentrations bien supérieures dans les êtres vivants à celles auxquelles ils se rencontrent dans les biotopes par suite des phénomènes de bioconcentration, parfois de bioamplification. L'analyse des organismes mesure la disponibilité réelle des polluants pour la biomasse, ce qui est beaucoup plus significatif en définitive que la connaissance de la concentration d'un polluant dans le milieu inerte. Les êtres vivants intègrent en quelque sorte les taux de contaminants présents pendant une période considérée, cela leur confère un intérêt supérieur aux constituants abiotiques dans lesquels la présence du contaminant peut être fugace. Depuis longtemps, les écotoxicologues se sont penchés sur les caractéristiques que devraient posséder une espèce bioindicatrice idéale. Bien que ces caractéristiques aient été établies dans le cas des polluants des eaux (Phillips, 1977, 1978; Hellowell, 1986; Mathes *et al*, 1991), elles peuvent être généralisées à tous les types de contaminants. Ces caractéristiques devraient être les suivantes :

1. tous les individus de l'espèce bioindicatrice devraient présenter une corrélation identique et simple entre leur teneur en la substance polluante et la concentration moyenne de cette dernière dans le biotope ou l'alimentation quelle que soit la localisation et les conditions environnementales
2. l'espèce devrait être capable d'accumuler le polluant sans être tuée ni même sans que sa reproduction ne soit perturbée par les niveaux maximum du polluant observés dans l'environnement
3. l'espèce devrait être sédentaire afin d'être sûr que les concentrations trouvées soient bien en rapport avec la localisation géographique considérée
4. l'espèce devrait être abondante dans l'ensemble de l'aire étudiée et si possible devrait avoir une distribution biogéographique étendue pour favoriser les comparaisons entre zones distinctes
5. les espèces à forte longévité sont préférables parce qu'elles permettent un échantillonnage sur plusieurs classes d'âges si nécessaire. Les espèces à forte longévité subissent de plus l'exposition à un contaminant pendant de longues périodes ce qui par suite permet de disposer de preuves expérimentales sur les effets à long terme
6. l'espèce devrait être de taille suffisante pour fournir des tissus en quantité importante pour analyse. Cette caractéristique s'avère aussi utile pour la dissection quand les recherches concernent l'accumulation dans des organes spécifiques
7. l'espèce devrait être facile à échantillonner, et, pour une espèce animale, assez résistante pour être amenée en laboratoire afin de réaliser par exemple des études de décontamination.

### **1- Les bivalves**

Les mollusques lamellibranches marins : moules, huîtres ont fait l'objet d'un large usage dans le monitoring des eaux estuariennes et littorales. L'aptitude des huîtres et des moules à la bioconcentration est démontrée de longue date. Compte tenu du fait que les moules sont des espèces ubiquistes et possèdent une aptitude extrême à accumuler les contaminants dans les parties molles de leur organisme, celles-ci représentent un matériel de choix pour la mise en oeuvre de programmes de surveillance de la pollution des eaux marines en tant que bioindicateurs de cette dernière.

### **2- Les poissons**

Les téléostéens d'eau douce et marins ont été utilisés à une vaste échelle comme bioindicateurs de pollution en milieu limnique ou océanique (Hellawell, 1986). Les espèces situées au sommet de la pyramide écologique, de régime prédateur ou superprédateur sont

susceptibles de présenter des facteurs de concentration supérieurs à  $10^5$  voire  $10^6$  fois par rapport à la teneur de l'eau en certains contaminants minéraux ou organiques. L'usage des poissons comme bioindicateurs a servi à une vaste campagne de surveillance de la pollution des bassins fluviaux américains par les PCB et les composés organochlorés entreprise aux Etats-Unis à la fin des années 70 (Veith *et al*, 1979).

## **II- La surveillance biologique ou la prévision des effets**

Diverses techniques de bioanalyse ont vu le jour depuis l'époque héroïque où le test de la toxicité létale aiguë utilisant la truite Arc-en-Ciel comme indicateur biologique régnait incontestablement seul dans le cadre d'études sur la toxicité en milieu aquatique. Celui-ci constituait toujours en 1981 l'unique moyen biologique du point de vue juridique par lequel on évaluait la toxicité des différents rejets liquides dans l'environnement au Canada. Dans les années 80, cependant, les outils biologiques pour fins d'évaluation de la toxicité, n'ont cessé de se multiplier. La période présente est nettement caractérisée par l'importance attachée aux aspects sublétaux, chroniques, persistants, bioaccumulateurs et mutagéniques de la toxicité en milieu aquatique et par l'amélioration particulièrement marquée apportée aux essais sur les bactéries ainsi qu'aux essais sur les protozoaires, les microalgues et les tissus cellulaires.

De nos jours, la directive européenne demande aux industriels notifiant la fabrication d'un produit chimique nouveau de déterminer tout un ensemble de caractéristiques relatives aux risques toxicologiques de ce dernier. A cette fin, cette directive recommande de suivre les lignes directrices de l'OCDE (1995). Alors qu'une simple déclaration est exigée pour les substances diffusées à moins d'une tonne par an, un dossier de notification complet est demandé au-dessus de cette quantité.

La déclaration d'un produit chimique exige la connaissance de ses propriétés physico-chimiques, de ses effets sur les systèmes biologiques (écotoxicologie), de sa dégradation et de son accumulation, ainsi que de ses effets sur la santé (toxicologie à court et à long terme, toxicologie génétique). La décision du conseil de l'OCDE sur l'acceptation mutuelle des résultats stipule que les Lignes Directrices doivent être acceptées dans les pays de l'OCDE à des fins d'évaluation ainsi que pour tout autre usage touchant à la protection de l'homme et de l'environnement (Allemagne, Australie, Autriche, Belgique, Canada, Danemark, Espagne, Etats-Unis, Finlande, France, Grèce, Irlande, Islande, Italie, Japon, Luxembourg, Norvège, Nouvelle-Zélande, Pays-Bas, Portugal, Royaume-Uni, Suède, Suisse, Turquie). Cinq groupes d'experts, venant d'universités, de gouvernements, de l'industrie, d'organisations internationales ou d'autres secteurs ont participé depuis 1978 à l'élaboration et la mise à jour de ces lignes directrices.

Les tests que l'OCDE recommande d'effectuer afin d'évaluer les risques toxicologiques d'un nouveau composé chimique sont les suivants :

### Section 1 – Propriétés physico-chimiques

- 101 Spectres d'absorption UV-VIS (1)
- 102 Point de fusion/Intervalle de fusion (11)
- 103 Point d'ébullition (11)
- 104 Pression de vapeur (11)
- 105 Solubilité dans l'eau (11)
- 106 Adsorption/Désorption (1)
- 107 Coefficient de partage (n-octanol/eau) : méthode par agitation en flacon (11)
- 108 Capacité à former des complexes dans l'eau (1)
- 109 Densité des liquides et des solides (11)
- 110 Distribution de la taille des particules/Distribution de la longueur et du diamètre des fibres (1)
- 111 Hydrolyse en fonction du pH (1)
- 112 Constante de dissociation dans l'eau (1)
- 113 Essai de sélection pour la stabilité thermique et la stabilité dans l'air (1)
- 114 Viscosité des liquides (1)
- 115 Tension superficielle des solutions aqueuses (11)
- 116 Liposolubilité des substances solides et liquides (1)
- 117 Coefficient de partage (n-octanol/eau), méthode CLHP (8)

### Section 2 – Effets sur les systèmes biologiques

- 201 Algues, essai d'inhibition de la croissance (5) (algues vertes d'eau douce)
- 202 *Daphnia* sp. essai d'immobilisation immédiate et essai de reproduction sur 14 jours (3)
- 203 Poisson, essai de toxicité aiguë (9)
- 204 Poisson, toxicité prolongée : étude de 14 jours (4)
- 205 Oiseaux, essai de toxicité liée au régime alimentaire (4)
- 206 Oiseaux, essai de reproduction (4)
- 207 Ver de terre, essais de toxicité aiguë (4)
- 208 Plantes terrestres, essai de croissance (4)
- 209 Boue activée, essai d'inhibition de la respiration (4) (évaluation sur des microorganismes en utilisant comme source bactérienne la boue activée provenant de stations de traitement des eaux usées).
- 210 Poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie (10)

### Section 3 – Dégradation et accumulation

- 301 Biodégradabilité facile <sup>(9)</sup>
  - 301 A : Essai de disparition du COD
  - 301 B : Essai de dégagement de CO<sub>2</sub>
  - 301 C : Essai du MITI modifié (I)
  - 301 D : Essai en flacon fermé
  - 301 E : Essai de "screening" modifié de l'OCDE
  - 301 F : Essai de respirométrie manométrique
- 302 A Biodégradabilité intrinsèque : essai SCAS modifié <sup>(1)</sup>
- 302 B Biodégradabilité intrinsèque : essai Zahn–Wellens/EMPA <sup>(9)</sup>
- 302 C Biodégradabilité intrinsèque : essai MITI modifié (II) <sup>(1)</sup>
- 303 A Essai de simulation – Traitement aérobie des eaux usées : essai d'unités couplées <sup>(1)</sup>
- 304 A Biodégradabilité intrinsèque dans le sol <sup>(1)</sup>
- 305 A Bioaccumulation : essai statique séquentiel chez le poisson <sup>(1)</sup>
- 305 B Bioaccumulation : essai semi–statique chez le poisson <sup>(1)</sup>
- 305 C Bioaccumulation : degré de bioconcentration dans le poisson <sup>(1)</sup>
- 305 D Bioaccumulation : essai statique chez le poisson <sup>(1)</sup>
- 305 E Bioaccumulation : essai dynamique chez le poisson <sup>(1)</sup>
- 306 Biodégradabilité dans l'eau de mer <sup>(10)</sup>

### Section 4 – Effets sur la santé

#### *Toxicologie à court et à long terme*

- 401 Toxicité orale aiguë <sup>(7)</sup> (rat)
- 402 Toxicité cutanée aiguë <sup>(7)</sup> (rat, lapin, cochon d'inde)
- 403 Toxicité aiguë par inhalation <sup>(1)</sup> (rat)
- 404 Effet irritant/corrosif aigu sur la peau <sup>(9)</sup> (lapin albinos)
- 405 Effet irritant/corrosif aigu sur les yeux <sup>(7)</sup> (lapin albinos)
- 406 Sensibilisation de la peau <sup>(9)</sup> (cobaye)
- 407 Toxicité orale à dose répétée – pendant 28 jours sur les rongeurs <sup>(11)</sup>
- 408 Toxicité orale subchronique – rongeurs : 90 jours <sup>(1)</sup>
- 409 Toxicité orale subchronique – non–rongeurs : 90 jours <sup>(1)</sup> (chien)
- 410 Toxicité cutanée à doses répétées : 21/28 jours <sup>(1)</sup> (rat, lapin, cochon d'inde)
- 411 Toxicité cutanée subchronique : 90 jours <sup>(1)</sup> (rat, lapin, cochon d'inde)
- 412 Toxicité à doses répétées par inhalation : 28/14 jours <sup>(1)</sup> (rat)
- 413 Toxicité subchronique par inhalation : 90 jours <sup>(1)</sup> (rat)
- 414 Tératogénèse <sup>(1)</sup> (rat, souris, hamster, lapine)

La Tératogénèse est la propriété d'une substance chimique de provoquer des anomalies structurelles ou fonctionnelles permanentes au cours de la période du développement embryonnaire.

- 415 Etude de toxicité pour la reproduction sur une génération <sup>(2)</sup> (rat, souris)
- 416 Etude de toxicité pou la reproduction sur deux générations <sup>(2)</sup> (rat, souris)
- 417 Toxicocinétique <sup>(4)</sup> (différentes espèces)
- 418 Neurotoxicité différée de substances organophosphorées à la suite d'une exposition aiguë <sup>(11)</sup> (poules)
- 419 Neurotoxicité différée de substances organophosphorées : étude à dose répétée sur 28 jours <sup>(11)</sup> (poules)
- 420 Toxicité orale aiguë – Méthode de la dose prédéterminée <sup>(10)</sup> (rat)
- 421 Essai de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement <sup>(12)</sup> (rat)
- 451 Etudes de cancérogénèse <sup>(1)</sup> (rat, souris)  
 Une étude de cancérogénèse à long terme a pour objectif d'observer les animaux d'expérience pendant la majeure partie de leur durée de vie pour suivre le développement éventuel de lésions néoplasiques après ou durant l'exposition à différentes doses d'une substance à tester administrée par une voie appropriée.
- 452 Etudes de toxicité chronique <sup>(1)</sup> (rat, chien, primate)
- 453 Etudes combinées de toxicité chronique et de cancérogénèse <sup>(1)</sup> (rat)

*Toxicologie génétique (voir également Annexe 1)*

- 471 Essai de "reverse mutation" sur *Salmonella typhimurium* <sup>(2)</sup>
- 472 Essai de "reverse mutation" : sur *Escherichia coli* <sup>(2)</sup>
- 473 Essai cytogénétique *in vitro* sur les mammifères <sup>(2)</sup>
- 474 Essai du micronucléus <sup>(2)</sup>
- 475 Essais cytogénétique *in vivo* sur moelle osseuse de mammifères – analyse chromosomique <sup>(4)</sup>
- 476 Essais *in vitro* de mutation génique sur des cellules de mammifères <sup>(4)</sup>
- 477 Essai de mutation létale récessive liée au sexe chez *Drosophila melanogaster* <sup>(4)</sup>
- 478 Essai de mutation létale dominante chez le rongeur <sup>(4)</sup>
- 479 Essai *in vitro* d'échange de chromatides–soeurs sur cellules de mammifère <sup>(6)</sup>
- 480 *Saccharomyces cerevisiae*, essai de mutation génique <sup>(6)</sup>
- 481 *Saccharomyces cerevisiae*, essai de recombinaison mitotique <sup>(6)</sup>
- 482 Lésion et réparation d'ADN – Synthèse non programmée de l'ADN (UDS) sur cellules de mammifère – *in vitro* <sup>(6)</sup>
- 483 Essai cytogénétique sur cellules germinales de mammifère <sup>(6)</sup>
- 484 Spot test chez la souris <sup>(6)</sup>

## 485 Essai de translocation héréditaire chez la souris <sup>(6)</sup>

- (1) Ligne directrice originale, adoptée le 12 mai 1981
- (2) Ligne directrice originale, adoptée le 26 mai 1983
- (3) Ligne directrice mise à jour, adoptée le 4 avril 1984
- (4) Ligne directrice originale, adoptée le 4 avril 1984
- (5) Ligne directrice mise à jour, adoptée le 7 juin 1984
- (6) Ligne directrice originale, adoptée le 6 octobre 1986
- (7) Ligne directrice mise à jour, adoptée le 24 février 1987
- (8) Ligne directrice originale, adoptée le 30 mars 1989
- (9) Ligne directrice mise à jour, adoptée le 17 juillet 1992
- (10) Ligne directrice originale, adoptée le 17 juillet 1992
- (11) Ligne directrice mise à jour, adoptée le 27 juillet 1995

### 1- Les tests d'écotoxicité ou l'écotoxicologie expérimentale

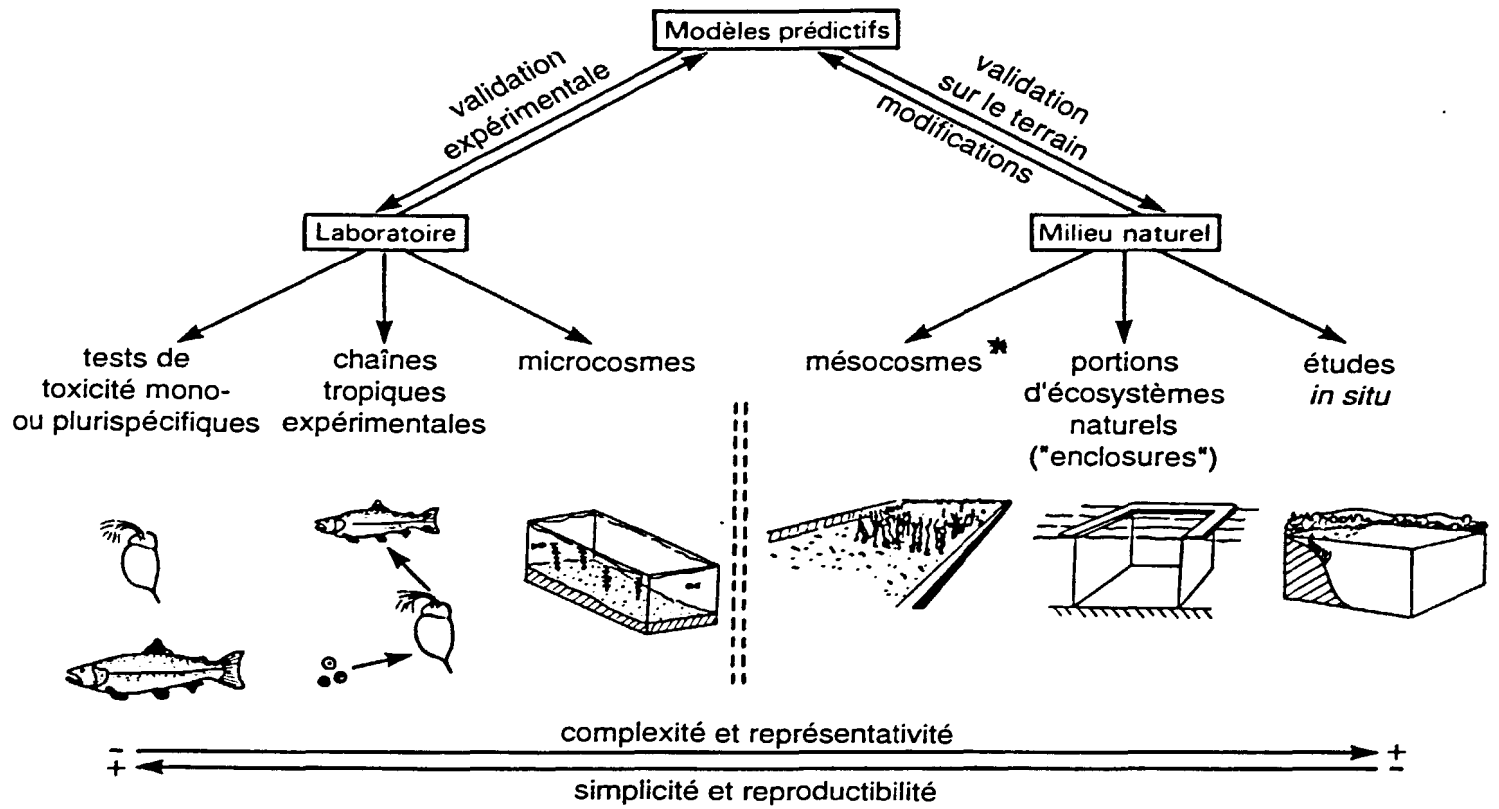
Il est possible de mettre en évidence dans chaque écosystème un ensemble d'espèces attestant d'un effet écotoxicologique de polluants, même s'ils sont présents à très faible concentration. De telles espèces sont en général d'une grande pollusensibilité, c'est-à-dire présentant une hyperréaction toxique à de très faibles concentrations d'un contaminant, pour lesquelles l'ensemble de la communauté ne présente aucune réaction écotoxicologique apparente. Les considérations précédentes ont conduit à développer en écotoxicologie expérimentale de nouvelles méthodologies destinées à étudier dans un contexte expérimental qui soit le plus proche possible des facteurs naturels d'exposition à un toxique dans les conditions réelles, le devenir de tel ou tel polluant dans des biotopes aquatiques ou terrestres (**Figure 1**). Les tests d'écotoxicité ont pour objet d'évaluer le degré de sensibilité (ou de résistance) à tel ou tel polluant toxique chez les diverses espèces animales ou végétales. En pratique, on cherche à déterminer les différentes formes de toxicité : par contact, par inhalation ou par ingestion et une évaluation quantitative de leurs principaux effets létaux ou sublétaux.

Parmi les tests d'écotoxicité en milieu aquatique préconisés par l'OCDE, seules les lignes directrices :

- 203 Poisson, essai de toxicité aiguë,
- 204 Poisson, toxicité prolongée,
- 210 Poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie.

peuvent s'appliquer à des espèces marines en plus des espèces d'eaux douces recommandées.





**Figure 1** : Modèles d'expérimentation pour un biotope aquatique (d'après Caquet *et al*, 1989).

\* mésocosme = mare naturelle

Les tableaux suivants donnent des exemples d'espèces de poissons recommandées pour l'essai. Les poissons mentionnés sont faciles à élever et/ou largement disponibles tout au long de l'année. Ils peuvent être produits et élevés dans des fermes piscicoles ou en laboratoire, avec un contrôle des maladies ou des parasites, ce qui permet d'obtenir des sujets d'essai sains et d'ascendance connue. Ces poissons sont disponibles dans de nombreuses régions du monde. En cas d'utilisation d'autres espèces satisfaisant aux critères ci-dessus, il importe d'adapter la méthode de façon à ce que l'essai se réalise dans des conditions adéquates.

#### Espèces de poissons recommandées pour les essais 203 et 204

Espèces recommandées	Températures recommandées pour l'essai (en ° C)	Longueurs recommandées des poissons (en cm)
<i>Brachydanio rerio</i> Danio zébré	21 – 25	2,0 ± 1,0
<i>Pimephales promelas</i> Tête-de-boule	21 – 25	2,0 ± 1,0
<i>Cyprinus carpio</i> Carpe commune	20 – 24	3,0 ± 1,0
<i>Oryzias latipes</i> Medaka	21 – 25	2,0 ± 1,0
<i>Poecilia reticulata</i> Guppy	21 – 25	2,0 ± 1,0
<i>Lepomis macrochirus</i> Crapet arlequin	21 – 25	2,0 ± 1,0
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Truite arc-en-ciel	13 – 17	5,0 – 1,0

## Espèces de poissons recommandées pour les essais 210

Eau douce	Eau salée
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Truite arc-en-ciel	<i>Cyprinodon variegatus</i> Sheepshead minnow
<i>Pimephales promelas</i> Tête-de-boule	
<i>Brachydanio rerio</i> Danio zébré	
<i>Oryzias latipes</i> Medaka	

## Exemples d'espèces qui ont également été utilisées

Eau douce	Eau salée
<i>Oncorhynchus kisutch</i> Saumon coho	<i>Menidia menidia</i> Capucette
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i> Saumon chinook	<i>Menidia peninsulæ</i> Athérine américaine
<i>Salmo trutta</i> Truite de rivière	
<i>Salmo salar</i> Saumon de l'Atlantique	
<i>Salvelinus fontinalis</i> Saumon de fontaine	
<i>Salvelinus namaycush</i> Truite de lac d'Amérique	
<i>Esox lucius</i> Brochet	
<i>Catostomus commersoni</i> Meunier noir	
<i>Lepomis macrochirus</i> Crapet arlequin	
<i>Ictalurus punctatus</i> Barbue de rivière	
<i>Jordanella floridae</i> Fondule de Floride	
<i>Gasterosteus aculeatus</i> Epinoche	
<i>Cyprinus carpio</i> Carpe commune	

## 1-1 – Nouveaux tests d'écotoxicité en milieu aquatique

En plus des tests précités et qui sont standardisés au niveau international, certains tests sur des espèces aquatiques appartenant à d'autres groupes taxonomiques que le phytoplancton d'eau douce, les daphnies (crustacés d'eau douce) et les poissons d'eau douce ont été développés à un niveau national par certains pays. Des propositions sont à l'étude (OCDE, 1995) concernant la standardisation de tests spécifiques au domaine marin pour lesquels les groupes taxonomiques préconisés sont :

Groupe taxonomique	Eaux marines chaudes	Eaux marines froides
Microalgues	X	X
Macroalgues	X	X
Plantes supérieures		X
Echinodermes (dont oursin, étoiles, concombres de mer)	X	X
Cnidaires (dont méduses)	X	
Protozoaires (ciliés)	X	X
Mollusques		X
Crustacés	X	X
Aschelminthes	X	
Amphibiens	X	
Poissons	X	X

L'annexe 2 donne les espèces marines recommandées pour la mise au point de nouveaux tests d'écotoxicité en milieu aquatique.

D'ores et déjà en France ont été mis au point des bioessais sur les embryons de mollusques bivalves (moule : *Mytilus edulis* ou *Mytilus galloprovincialis*, huître : *Crassostrea gigas*) et sur les échinodermes (oursin : *Sphaerechinus granularis* ou *Paracentrotus lividus*) afin d'évaluer la toxicité de sédiments, de rejets urbains ou de matériel anti-fouling. Les paramètres mesurés sont le développement embryonnaire ou larvaire, la reproduction, la fertilisation, la croissance (Lassus *et al*, 1990; Quiniou et Toularastel, 1991; Quiniou *et al*, 1995a; Trieff *et al*, 1995; His *et al*, 1995).

En effet, chez les bivalves le développement embryonnaire est très sensible à la qualité du milieu. Le stade larve "D" est atteint en 48 h chez *Mytilus edulis* et en 24 h chez *Crassostrea gigas*. Après obtention des gamètes par stimulation thermique la fécondation est réalisée directement dans l'eau à tester et l'incubation se fait à 20° C pour la moule et 24° C pour l'huître. La toxicité globale des milieux est mesurée par le pourcentage des larves "D" anormales et comparé à celui obtenu dans une eau de référence.

Un autre test fait appel à l'utilisation d'une bactérie bioluminescente : *Phosphobacterium phosphoreum* (test Microtox<sup>®</sup> commercialisé par MICROBICS CORPORATION) (Quiniou *et al*, 1993, 1995b). Le test Microtox<sup>®</sup> est une méthode sensible basée sur la bioluminescence d'une bactérie marine qui peut être activée ou inhibée en présence de substance toxique. L'intensité de la lumière émise est fonction du flux d'électrons de la chaîne respiratoire et reflète directement l'activité métabolique de la cellule fournissant ainsi une mesure quantitative de la toxicité. La méthode développée à partir de 1979 en eau douce pour évaluer la toxicité des substances chimiques, a été ensuite adaptée au milieu marin. Le test Microtox permet le screening d'un grand nombre de toxiques et d'effluents en un temps court et à un coût peu élevé.

### 1-2 – Les constantes mesurées

La plus fréquente des constantes déterminable par la pratique de tests d'écotoxicité en rapport avec la relation mortalité–dose est la **DL 50** (= dose létale moyenne), encore dénommée dose létale 50 %. Dans le cas de composés volatils (polluants atmosphériques) ou des eaux, la pratique de ces tests mortalité–concentration permet la détermination de la **CL 50** (concentration létale moyenne), valeur théorique, comme la DL 50, provoquant 50 % de mortalité dans la population étudiée. On parle aussi de CL 50 dans les tests de contaminants agissant par contact. On exprime alors la concentration par unité de surface et non de volume (cas d'une substance dispersée sur un substrat quelconque, par exemple sur le feuillage d'un végétal). **DL 50** et **CL 50** s'évaluent en général après 24 h ou 48 h d'exposition dans les tests de toxicité aiguë, voire de façon standardisée après 96 h dans les tests d'écotoxicologie aquatique.

Il est également possible de calculer le temps léthal moyen **TL 50**, temps théorique après lequel doivent périr 50 % des individus exposés à une dose (ou une concentration) déterminée. Ces tests conduisent à l'obtention d'une série de valeurs expérimentales qui traduisent les relations mortalité–dose ou mortalité–temps.

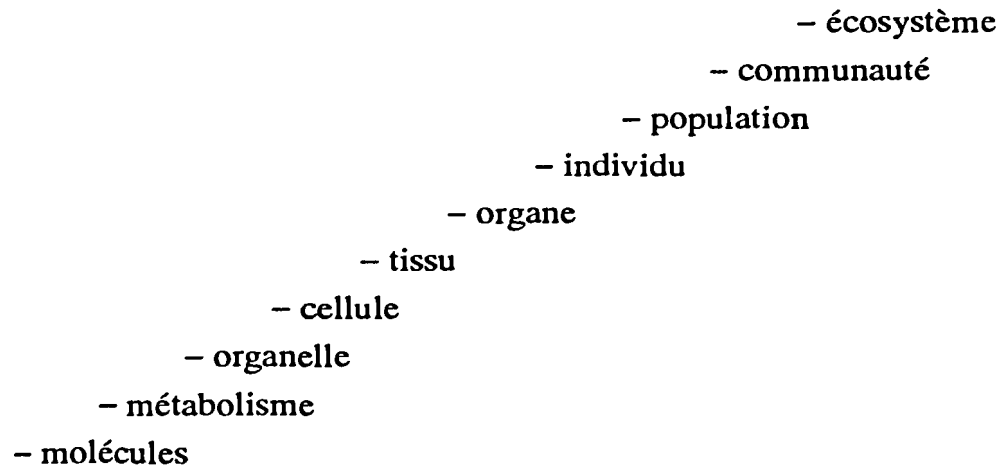
La mortalité peut être difficile à apprécier avec certaines substances et chez certaines espèces d'invertébrés. Dans ce cas, on se réfère à un autre paramètre qui n'est plus la dose létale mais la concentration d'immobilisation **IC**. **L'IC 50** correspond par exemple à la concentration qui inhibe la motricité dans 50 % de la population testée. Ce paramètre est très employé dans les tests d'organismes aquatiques peu actifs comme certains crustacés du zooplancton (Cladocères par exemple).

D'autre part, on dénomme sous le terme général de **CE 50** une concentration efficace sur tel ou tel processus physiologique dont elle provoque 50 % d'inhibition ou de diminution. Dans le cas de la fécondité, la CE 50 d'un polluant sera par exemple la concentration du polluant dans l'eau qui provoquera une diminution de 50 % du succès de reproduction de l'espèce

considérée (par exemple diminution de moitié de la natalité). On peut envisager une CE 50 pour la croissance, c'est-à-dire la concentration du même polluant qui ralentira de 50 % la vitesse de croissance d'un végétal ou d'une espèce animale donnée ou encore 50 d'inhibition de la photosynthèse nette chez un végétal, etc.

## 2- La recherche de biomarqueurs (physiologiques, biochimiques, génétiques)

Durant les 20 dernières années, les effets toxicologiques des polluants dans l'environnement aquatique ont été évalués principalement au niveau des populations, des communautés et des écosystèmes grâce à la mise en oeuvre des tests écotoxicologiques. Cependant, dans les années 80 un effort croissant a été fourni dans la recherche de biomarqueurs (appelé parfois bioindicateurs ou biocritères) à un niveau cellulaire et moléculaire : modifications biochimiques, physiologiques, histologiques et aberrations chez les organismes exposés aux polluants.



**Figure 2 : Les différents niveaux d'organisation biologique**

Les biomarqueurs peuvent être non spécifiques ou spécifiques d'un polluant. Parmi les biomarqueurs non spécifiques certains permettent cependant d'évaluer l'altération d'un organe particulier après exposition : c'est le cas des tests de fonctionnement d'organes, des tests histopathologiques, des dosages d'enzymes et isoenzymes particulières dont l'activité métabolique est liée à l'organe à évaluer (par exemple dosages sanguins de la lactate

déshydrogénase, la créatinine phosphokinase, l'alkaline phosphatase). Chez les poissons, Lockhart *et al* (1975) et Versteeg (1985) ont utilisé ce type de biomarqueur.

Les biomarqueurs spécifiques d'un polluant sont, eux, révélateurs de l'exposition à un composé chimique ou un groupe de composés appartenant à la même famille chimique et sont représentés par certaines activités enzymatiques particulières ou certaines biomolécules particulières dans les tissus. Parmi les enzymes et les protéines qui donnent une réponse spécifique à un type de polluant, nous pouvons citer :

- l'acétylcholinestérase, dont l'activité dans le système nerveux et le plasma est inhibée par les pesticides organophosphorés (Coppage *et al*, 1975; Grue *et al*, 1983; Lowe-Jinde & Niimi, 1984; Hooper, 1988)
- le système cytochrome P450 monooxygénases (Burns, 1976; Lech *et al*, 1982; Payne *et al*, 1987; Rattner *et al*, 1989)
- les métallothionéines et les protéines fixatrices de métaux (Dixon & Sprague, 1981)
- la  $\delta$ -aminolévulinique acide deshydratase (ALAD) (Hodson *et al*, 1984).

Les recherches se sont orientées récemment vers de nouveaux types de biomarqueurs tels que les modifications de la réponse immunitaire après exposition à un composé toxique qui pourraient permettre de développer des immunotests utilisables en milieu naturel (études récentes sur les petits mammifères et les poissons, Porter *et al*, 1984; Spitsbergen *et al*, 1986) , et tels que les modifications biochimiques associées à l'apparition de mutations et de cancers.

## 2-1 – Les marqueurs physiologiques et biochimiques non spécifiques

Parmi les marqueurs non spécifiques, nous pouvons citer la croissance, la fonction énergétique, la fonction endocrine, la fonction immunitaire, la fonction de détoxification (phase II), la réponse à l'oxydation, les protéines et les enzymes constitutives, la chimie du sang.

### 2-1-1- La croissance

L'impact d'un stress sur la croissance peut être mis en évidence par mesure de la diminution de la concentration en ARN cellulaire (acide ribonucléique) ramenée soit à la concentration en protéines soit à la concentration en ADN de la cellule ( $[ARN]/[protéines]$  ou  $[ARN]/[ADN]$ ), ce qui traduit un impact sur le processus de transcription des gènes. Le deuxième paramètre révélateur d'un impact sur la croissance consiste à mesurer le niveau de la synthèse protéique, par incorporation d'acides aminés marqués notamment, ce qui traduit une altération de la fonction de traduction des ARN messagers en protéines.

## 2-1-2- L'activité énergétique

### *L'énergie métabolique (AEC Adenylate Energy Charge)*

L'énergie métabolique d'un organisme correspond à l'énergie dont il dispose à partir d'ATP, ADP et AMP (Adenosine Triphosphate, Diphosphate et Monophosphate respectivement). En général, en conditions de stress, la concentration cellulaire en ATP diminue et provoque une baisse de la valeur de l'énergie métabolique (Haya & Waiwood, 1983).

### *Les réserves énergétiques*

Le contenu en glycogène (forme de stockage du glucose) et en lipides des tissus est généralement diminué après exposition à un stress chimique. Il faut cependant tenir compte des facteurs physiologiques intrinsèques tels que la croissance et la reproduction qui influent également sur l'état de ces réserves. En conditions de stress, et après utilisation du glycogène et des lipides, les protéines peuvent être mobilisées comme source d'énergie, via l'oxydation des acides aminés, ce qui provoque une augmentation de l'excrétion en azote et une diminution du rapport  $\frac{O}{N}$  (Oxygène consommé/Azote excrété).

### *Les enzymes du métabolisme énergétique*

La plupart des enzymes concernées participent au catabolisme des sucres via la glycolyse : la glycogène phosphorylase, les kinases (hescokinase, phosphofructokinase, pyruvate kinase), l'isocitrate deshydrogénase, la glutamate deshydrogénase, l'aspartate aminotransférase, la glucose 6-phosphate deshydrogénase, la lactate deshydrogénase. De nombreux travaux ont été effectués sur l'effet des composés toxiques sur les enzymes de la glycolyse chez les poissons et les invertébrés. Cependant, ces enzymes présentent une grande variabilité en fonction des espèces et des conditions physiologiques naturelles.

### *L'énergie de croissance et de reproduction (SFG Scope For Growth)*

Cette énergie correspond à l'énergie qui résulte de la différence entre l'énergie absorbée sous forme de nourriture et l'énergie perdue par la respiration et l'excrétion. C'est un critère qui s'avère utile pour le suivi des écosystèmes.



### 2-1-3- L'activité endocrine

La mesure des activités hormonales dans le plasma permet d'évaluer l'impact des contaminants sur le métabolisme, la croissance et la reproduction. Les dosages concernent notamment : les corticostéroïdes (dont cortisol et cortisone), les catecholamines (épinephrine, norepinephrine, dopamine), les hormones de la reproduction (androgènes, oestrogènes et progestérone), les hormones thyroïdiennes (thyroxine et triiodothyronine), les hormones pancréatiques (insuline, glucagon), les hormones de croissance.

### 2-1-4- La réponse immunitaire

L'altération de certaines fonctions immunitaires par les xénobiotiques a été mise en évidence en toxicologie à la fin des années 70 (Vos, 1977; Sharma, 1981; Dean *et al*, 1985). Les composants humoraux, cellulaires et moléculaires de la réponse immunitaire constituent autant d'informations révélatrices de l'exposition à un stress. L'interaction avec les composés chimiques de l'environnement peut déprimer ou au contraire stimuler l'activité immunitaire, ce qui, par voie de conséquence, modifie la réaction de défense de l'organisme face aux agents pathogènes et au développement de lésions néoplasiques. Le système immunitaire des poissons possède un haut degré de complexité dont les mécanismes sont, pour la plupart, similaires à ceux présents chez les vertébrés supérieurs (Cushing, 1970). Ainsi, une réponse immunitaire à médiation cellulaire qui présente une homologie avec le complexe majeur d'histocompatibilité des mammifères a été démontrée chez les poissons téléostéens (Corbel, 1975).

Des tests ont été proposés et organisés en 3 phases successives d'expérimentation par plusieurs auteurs afin d'évaluer l'effet des composés chimiques sur la réponse immunitaire des animaux vertébrés et invertébrés (voir Tableau 4, Vos, 1980; Kohler & Exon, 1985; Kerkvliet, 1986; Luster *et al*, 1988). Des agrégats de macrophages contenant de la mélanine ont été mis en évidence par microscopie électronique dans la rate, le foie et les reins de poissons exposés à des composés toxiques.

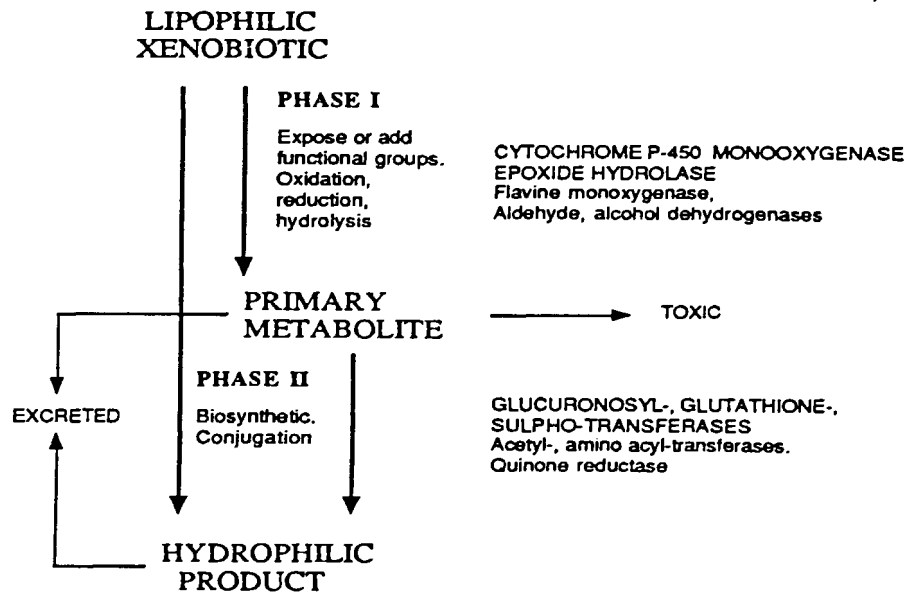
Cependant, l'application de ces tests aux animaux issus du milieu naturel s'avère difficile. En effet, le stress de la capture et de la mise en captivité peut provoquer une forte perturbation de la réponse immunitaire. Ainsi, malgré la mise au point de techniques spécifiques applicables à l'étude de l'immunité chez les poissons (Stolen *et al*, 1990), les résultats obtenus sur les effets immunologiques des composés toxiques de l'environnement sur les animaux restent contradictoires. En effet pour un même composé chimique, les auteurs signalent une immunosuppression ou, au contraire, une immunostimulation, ou encore une absence d'effet (Zeeman & Brindley, 1981; Robohm, 1986; Weeks *et al*, 1990). Cette variabilité dans les résultats reflète à la fois des différences inter-espèces et la complexité du système immunitaire lui-même.

Tableau 4 : Tests d'évaluation de la fonction immunitaire (d'après Weeks *et al*, 1992)

Test	Composant immunitaire	Invertébrés	Vertébrés		
		Ver de terre	Poissons	Oiseaux	Mammifères
<b>Phase I : Screening</b>					
Formule sanguine	Général	+	+	+	+
Numération cellulaire	Général	+	+	+	+
Hématocrite	Général	-	+	+	+
Leucocrite	Général	-	+	-	-
Poids des organes (rate, thymus, etc.)	Général	-	+	+	+
Histologie (rate, thymus, ganglions lymphatiques, etc.)	Général	+	+	+	+
Cicatrisation	Inflammation	+	+	-	-
Lymphocytes tueurs	Non spécifique	+	+	+	+
Macrophages	Non spécifique	+	+	+	+
Activité lysosomale	Non spécifique	+	+	+	+
Essai d'agglutination	Humoral	+	+	+	+
Chimioluminescence des macrophages	IMC	-	+	-	+
Rejet de greffe	IMC	+	+	+	+
Aggrégats de macrophages contenant de la mélanine	IMC	-	+	-	-
<b>Phase II : Evaluation des acteurs de la réponse immunitaire</b>					
Numération cellules immunitaires par marqueurs de surface	Général	+	+	+ (poulet)	+
par cytométrie de flux		+	+	-	+
Numération immunoglobulines natives	Humoral	-	+	+ (poulet, canard sauvage)	+
Quantification immunocytes					
Blastogénèse des lymphocytes	Humoral	+	+	+	+
Réponse leucocytaire	IMC	+	+	+	+
Activité leucocytaire	IMC	+	+	-	+
Réponse immunitaire différée	IMC	+	+	-	+
Réponse macrophagique	IMC	-	-	+	+
Accumulation de mélanine	Non spécifique		+	-	+
Chimiotaxis		-	+	-	-
Pynocytose		-	+	-	+
Réduction du Bleu de Tétrazolium		-			
Quantification de la lymphokine (interférons)	Non spécifique Médiateurs solubles	+	+	+	+
		-	(±)	+ (poulet)	+

Phase III : Résistance à l'infection					
Mortalité		+	+	+	+
Quantification des tumeurs après infection par bactéries, virus ou parasites		+	+	+	+
Quantification des anticorps spécifiques	Humoral	-	+	+	+

NB : IMC = immunité à médiation cellulaire



**Figure 3** : Phase I et Phase II du métabolisme des xénobiotiques (Aquatic Toxicology, D.C. Malins, G.K. Ostrander, Eds, Lewis Publishers, 1994, p.39)

## 2-1-5- La fonction de détoxification (Phase II)

La biotransformation des xénobiotiques s'effectue grâce à une série de réactions enzymatiques qui appartiennent pour la majorité d'entre elles aux deux grandes phases du processus appelées phase I et phase II (Figure 3). La phase I correspond généralement à une étape d'oxydation du xénobiotique par le système cytochrome P450 monooxygénases (Nebert *et al*, 1991). La phase II quant à elle, catalyse grâce à des enzymes de conjugaison, la liaison des métabolites issus de la phase I à différents composés endogènes hydrosolubles présents à forte concentration dans la cellule. Ces réactions de conjugaison, tout en réduisant la toxicité du xénobiotique, permettent d'accroître sa solubilité dans l'eau et sa vitesse d'élimination. Les plus importantes et les plus étudiées des enzymes de phase II sont les glutathion S-transférases (GST), les UDP-glucuronosyltransférases (UDPGT) et les sulfotransférases (ST) qui permettent la liaison des métabolites au glutathion, à l'acide glucuronique et à un groupement sulfate respectivement (Mannervik & Danielson, 1988; Burchell *et al*, 1991; Falany, 1991). L'époxyde hydrolase (EH) joue également un rôle important dans le processus de biotransformation en permettant l'hydroxylation, par addition d'une molécule d'eau, des composés époxydes formés lors de la phase I. Ces enzymes, comme la plupart des enzymes qui possèdent une spécificité de substrat large, appartiennent à des familles multigéniques et se présentent sous différentes isoformes.

Les enzymes de phase II sont présentes chez la plupart des espèces et certaines études de laboratoire indiquent que l'activité des GST, UDPGT et EH est influencée par l'exposition à divers contaminants environnementaux.

### *Les glutathion S-transférases (GST)*

A l'exception d'une seule forme microsomale récemment caractérisée par Morgensten *et al* (1990), les GST sont des enzymes dimériques solubles constituées de sous-unités identiques ou différentes de masse molaire comprise entre 25 et 28 KDa. Elles sont particulièrement abondantes dans le foie où elles représentent plus de 10 % des protéines cytosoliques ont été purifiées et plusieurs de leurs gènes clonés chez le rat, la souris et l'homme (Pickett & Lu 1989; Hayes *et al*, 1990b).

### *Les UDP-glucuronosyltransférases (UDPGT)*

Les ADN complémentaires (ADNc) de plusieurs UDPGT incluant celles qui présentent une spécificité pour les phénols, la biliruline (2 isoformes) et les stéroïdes, ont été clonés et séquencés chez le rat et l'homme. L'extrémité COOH terminale des protéines contient un domaine transmembranaire hydrophobe caractéristique.

### *Les sulfotransférases*

Les ST sont des enzymes cytosoliques qui conjuguent les groupements hydroxyl des composés polyaromatiques, des alcools aliphatiques, des amines aromatiques et des hydroxylamines avec le 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) activé pour former un monoester de sulfate. Chez les mammifères 4 classes de ST ont été identifiées qui présentent une spécificité pour :

- les stéroïdes phénoliques,
- les hydroxystéroïdes,
- les sels biliaires,
- les phénols, catechols et hydroxylamines.

Chez les poissons, le métabolisme des xénobiotiques fait intervenir, comme chez les mammifères, des enzymes de Phase I et des enzymes de Phase II (Chambers & Yarborough, 1976; Bend *et al*, 1977; James, 1987). Le métabolisme des pesticides a été décrit chez les poissons dès 1976 par Kahn *et al*, tandis que celui des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) l'a été dans les années 80 par Tan & Melius (1986) et Varanasi (1989).

Comme chez les mammifères, la glucuronidation est une étape très importante dans le processus de détoxification et d'excrétion des xénobiotiques chez les poissons. Les conjugués glucuronide de divers composés ont ainsi été détectés dans la bile, l'urine et plusieurs tissus (Clarke *et al*, 1991). Les études *in vitro* ont montré que les UDPGT du foie de poisson possèdent les mêmes propriétés que les UDPGT de mammifères. Leur activité est microsomale et le maximum d'activité est obtenu à 37° C à pH neutre et en présence d'ions  $Mg^{2+}$  (Castren & Oikari, 1983). Le foie est le tissu principal où s'effectue la glucuronidation bien qu'une activité significative ait été détectée dans des tissus extrahépatiques tels que les reins, les ouïes et l'intestin. Clarke *et al* (1992) on montré que les UDPGT de poisson étaient inductibles.

L'importance relative des GST et des ST, par contre, est encore mal appréciée car peu d'études leur ont été consacrées. Globalement, les informations dont nous disposons actuellement sur les enzymes de Phase II chez les poissons sont encore parcellaires et nécessitent un effort de recherche afin de pouvoir évaluer leur plein potentiel comme marqueurs d'exposition ou d'effet.

### 2-1-6- La réponse à l'oxydation

La biologie des radicaux libres et du stress oxydatif ont fait l'objet d'investigations intensives de la part du milieu biomédical ces dernières années. Les études menées ont permis d'élucider les mécanismes de la production endogène ou xénobiotique-dépendante (Kappus, 1986) des oxyradicaux ainsi que les mécanismes de la réponse antioxydante.

La toxicité liée à l'oxygène correspond aux effets toxiques d'espèces moléculaires dans lesquelles l'oxygène est activé et qui sont appelées radicaux libres oxygénés ou oxyradicaux, en particulier les 3 produits de réduction de l'oxygène moléculaire  $O_2$  (1, 2 et 3 électrons) : l'anion superoxyde  $O_2^-$ , le peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée  $H_2O_2$ , et le radical hydroxyl  $HO\cdot$ . Les perturbations biochimiques associées à l'augmentation de la teneur en oxyradicaux se traduisent notamment par la peroxydation des lipides et l'oxydation de l'ADN entre autres conséquences sur le métabolisme (Halliwell & Gutteridge, 1985). Un certain nombre d'enzymes et de molécules possédant une activité anti-oxydante permettent à l'organisme de lutter contre cette toxicité : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, les peroxydases, les glutathion réductases, le glutathion, l'ascorbate (vitamine C) et l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E).

Il a été démontré chez les mollusques une induction de l'activité de la SOD, de la glutathion peroxydase et de la catalase en réponse à l'exposition à des polluants organiques (Livingstone *et al*, 1990; Porte *et al*, 1991).

### 2-1-7- Les protéines et les enzymes constitutives

#### *Les protéines biomarqueurs de stress*

Toutes les cellules modifient de façon importante l'expression de leurs gènes en réponse à un stress environnemental. Ce changement dans l'activité transcriptionnelle traduit la mise en place d'un système de protection de la cellule contre les dégâts occasionnés et afin de les réparer (Sanders, 1990). Cette réponse cellulaire, initialement découverte comme la conséquence de l'exposition à un choc thermique, peut être également initiée par des agents stressants d'origine physique ou chimique. Les changements dans l'expression génique associés à la réponse au stress sont extrêmement rapides et résultent en l'induction de la synthèse et en l'accumulation de protéines appelées protéines de stress. Certaines de ces protéines apparaissent spécifiquement dans les cellules stressées, mais la majorité d'entre elles existent déjà dans les cellules non stressées à faible concentration où elles jouent un rôle dans le métabolisme cellulaire normal (Welch, 1990).

La plupart des gènes codant pour ces protéines ont été séquencés chez un grand nombre d'organismes et sont apparus comme remarquablement conservés. Les bactéries, les levures, la drosophile et les lignées cellulaires de mammifères ont été les plus étudiées (Schlesinger *et al*, 1982).

Les principales protéines de stress sont réparties en 2 grands groupes : les hsps (heat shock proteins) dont la synthèse est très fortement induite par la chaleur et une variété d'autres agents stressants tels que les métaux lourds, les xénobiotiques, les stress oxydatifs et ioniques, les agents tératogènes et hépatocarcinogènes, et les grps (glucose regulated proteins) dont la synthèse est induite dans les cellules non alimentées en glucose ou en oxygène. Le **Tableau 5** résume les propriétés de ces protéines de stress comme biomarqueurs.

#### a) les hsps (heat shock proteins)

Chez les eucaryotes ont été identifiées 5 hsps : les hsps 90, 70, 60, 20–30 (de masse molaire en gel de polyacrylamide SDS–PAGE respectivement 90, 70, 60 20–30 KDa), qui correspondent à des familles multigéniques dont les membres sont régulés par différents promoteurs et codent pour des protéines isoformes. La 5e hsp est appelée ubiquitine et a une masse molaire de 8KDa.

Chez les mammifères les hsps 90 sont abondantes dans les cellules en conditions normales et leur synthèse est augmentée d'un facteur 3 à 5 lors de l'exposition à un stress. Ces protéines interviendraient lors de l'altération du signal de transduction. Toujours chez cette espèce, les hsps 70 sont représentées par une protéine de 73 KDa présente dans les cellules non stressées et fortement induite par les agents stressants, et par une protéine de 72 KDa synthétisée seulement en réponse à un stress. Leur fonction serait celle de stabiliser ou solubiliser une protéine particulière (protéine de sécrétion ou organocellulaire) ayant besoin d'être transportée à travers les membranes. En conditions de stress, les hsps 70 participent à la restauration de la fonction nucléolaire qui se traduit alors par une perte d'intégrité, une perte d'ARN ribosomique et la formation de complexes pré-ribosomiaux dénaturés : après migration vers le nucléole, elles résolubilisent les complexes ribosomiaux dénaturés. Les hsps 70 constituent une famille de protéines parmi les plus conservées en biologie. Les hsps 60 sont présentes dans les mitochondries comme protéines chaperonnes qui facilitent la translocation et l'assemblage de protéines oligomériques dans la mitochondrie. Les hsps 20–30 sont les moins bien conservées des protéines de stress et montrent une forte spécificité d'espèces : chez la levure 1 protéine de 26 KDa, chez les mammifères 1 protéine de 28 KDa, chez la drosophile 4 protéines de 28, 26, 23, 22 KDa, chez les plantes jusqu'à 20 protéines différentes.

Chez la moule *Mytilus edulis* 2 protéines de masse molaire 29 et 32 KDa ont été identifiées (Sanders, 1988).

L'ubiquitine est présente dans toutes les cellules eucaryotes. En conditions normales cette protéine est impliquée dans la dégradation non lysosomale des protéines intracellulaires en se conjuguant à celles-ci grâce au système ubiquitine-protéine ligase. Dans les cellules stressées, l'ubiquitine complète l'action de résolubilisation et de stabilisation des hsp 70 en ciblant les protéines dénaturées pour la dégradation et l'élimination.

b) Les grps (glucose regulated proteins)

Les principales grps ont des masses molaires de 100, 80 et 75 KDa et sont structurellement et fonctionnellement reliées aux hsp. Les grps 75 et 80 sont homologues à la famille hsp 70, les grps 100 sont homologues à la famille hsp 90. Les grps sont présentes dans les cellules non stressées et sont induites en conditions anoxiques. Les grps 100 sont présentes comme protéines transmembranaire dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Les grps 80 sont impliquées dans la stabilisation ATP-dépendante, la structuration et l'assemblage des protéines du réticulum endoplasmique. Les grps 75 jouent le même rôle que les grps 80 au sein des mitochondries.

**Tableau 5 : Les protéines de stress comme biomarqueurs (d'après Stegeman et al, 1992)**

Protéine de stress	Inducteurs	Exposition	Effet biologique
hsp90	Chaleur, métaux	++	+
hsp70	Chaleur, métaux, UV, xénobiotiques, stress oxydatif	+++	++
hsp60	Chaleur, métaux, xénobiotiques, stress oxydatif	++	+++
hsp20-30	Métaux, xénobiotiques, chaleur, hormones stéroïdes	++	++
Ubiquitine	Chaleur	+	+
grps groupe	Anoxie, plomb, carence en glucose	+	-

*Note : les signes +, ++, +++ indiquent la sensibilité relative des protéines dans l'indication de l'exposition et des effets biologiques.*

Les essais basés sur l'utilisation d'anticorps contre les protéines de stress, présentent le meilleur potentiel en surveillance de l'environnement car ils permettent



de quantifier directement l'accumulation de ces protéines. Parmi toutes les protéines de stress la famille hsp 70 est le candidat idéal pour l'évaluation du stress général car elle est fortement inductible et est présente à concentration élevée dans les tissus des organismes exposés aux perturbations de l'environnement. De plus, comme les hsp 70 sont fortement conservées il est possible de développer des anticorps qui reconnaîtraient ces protéines chez un grand nombre d'organismes. Ainsi Sanders (1988) a montré qu'un anticorps monoclonal contre une protéine hsp 70 de mammifère reconnaît 2 protéines majeures de la famille hsp 70 chez la moule.

D'autres protéines de stress sont plus liées à un type d'agent stressant : ainsi l'hème oxygénase dont le rôle est essentiel dans le catabolisme de l'hème des oxygénases (clivage de l'hème en biliverdine qui est ensuite réduite en bilirubine) est inductible par une variété d'agents qui causent des dommages oxydatifs comme les UVA, l'arsenite de sodium, l'eau oxygénée et les métaux comme le cadmium Cd, le cuivre Cu, le Zinc Zn et le plomb Pb. De même, les métallothionéines, protéines de faible masse moléculaire ( $\geq 10$  KDa) et riches en Cystéine qui ont la particularité de se fixer aux métaux, sont induites par ceux-ci. Ainsi chez les mammifères, les organismes exposés à des teneurs élevées en cadmium Cd, mercure Hg, zinc Zn et cuivre Cu répondent par la synthèse de novo de métallothionéines hépatiques et rénales qui ensuite chélatent l'excès de métaux ayant pénétré le tissu. Les métallothionéines ont ainsi un rôle de protection contre les métaux toxiques. Cependant, il apparaît qu'au moins chez les mammifère, les insectes, et les crustacés, les métallothionéines sont également induites par d'autres agents tels que les stéroïdes et les peptides hormonaux.

*La  $Na^+/K^+$ -ATPase :*

Cette enzyme membranaire est responsable du transport des ions sodiums  $Na^+$  et potassium  $K^+$  à travers la cellule et du maintien des gradients  $Na^+$  et  $K^+$  transmembranaires. L'inhibition de son activité peut être due à une diminution de la disponibilité en ATP (Adenosine TriPhosphate) ou à un effet toxique direct d'un xénobiotique sur l'enzyme (Haya & Waiwood, 1983). Ainsi la  $Na^+/K^+$ -ATPase est sensible à divers composés organochlorés et aux métaux. Elle est également sujette à des variations d'activité en conditions physiologiques normales.

### 2-1-8- La chimie du sang

Le dosage de certains composés sanguins permet de révéler l'exposition à un stress, en particulier :

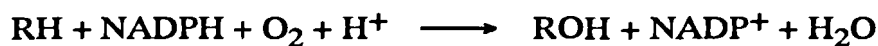
- les enzymes du sérum, dont certaines sont révélatrices de l'altération des tissus comme les enzymes lysosomales, la lactate déshydrogénase, ou bien d'un organe comme l'acide phosphatase révélatrice de l'altération de la prostate chez l'homme et les transaminases révélatrices de l'altération et du dysfonctionnement du coeur ou du foie
- la concentration en ions sodium  $\text{Na}^+$ , chlorure  $\text{Cl}^-$ , calcium  $\text{Ca}^{++}$  et magnésium  $\text{Mg}^{++}$
- la concentration en glucose et lipides dans le sérum.

### 2-2- Les marqueurs biochimiques spécifiques

#### 2-2-1 Le système enzymatique de détoxification MFO (Mixed Function Oxydase System)

Les organismes ont développé la capacité à utiliser l'oxygène moléculaire  $\text{O}_2$  pour générer de nouvelles structures chimiques par incorporation d'atomes d'oxygène grâce à des enzymes appelées oxygénases.

Chez les eucaryotes, ce sont essentiellement des monooxygénases dont le mécanisme général d'action est le suivant :



où  $\text{RH}$  = substrat,  $\text{ROH}$  = produit hydroxylé

Deux groupes majeurs de monooxygénases sont impliqués dans la biotransformation des xénobiotiques : les monooxygénases à Flavine (Flavoprotein Monooxygenases FMO), et les monooxygénases hémiques ou cytochromes P450. Les 2 types d'enzymes provoquent le clivage hétérolytique de la liaison O-O de l'oxygène moléculaire. Ce sont des enzymes membranaires particulièrement abondantes dans le réticulum endoplasmique (RE). Le métabolisme des xénobiotiques par les FMO ou les cytochromes P450 peut conduire à la détoxification ou au contraire à la toxification d'un substrat, lorsque celui-ci est converti en un produit final plus toxique que le composé parent initial. Seuls les

cytochromes P450 sont inductibles par les substances chimiques xénobiotiques suivant un processus d'activation transcriptionnelle et/ou traductionnelle.

Les propriétés des FMO et des cytochromes P450 que l'on trouve chez les eucaryotes et chez les bactéries sont comparées dans les Tableaux 6 et 7 (d'après Stegeman & Hahn, 1994).

	Bactéries	Eucaryotes
Groupement prosthétique	FAD	FAD
Donneur d'électron	NADH	NADPH
Localisation	Soluble	Membranaire
Substrats	Variés, comprenant les cycles aromatiques (ex : acide para-hydroxybenzoïque)	Amines secondaires et tertiaires, thiols, sulfides...
Spécificité	Généralement étroite	Large
Régulation	Inductible par les substrats	Généralement non inductible
Phylogénie	Culture aérobie	Mammifères, poissons, invertébrés

FAD = Flavine Adénine Dinucléotide

NADH = Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NADPH = Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

**Tableau 6 : Les monooxygénases à Flavine (FMO)**

	Bactéries	Eucaryotes
Groupement prosthétique	Hème	Hème
Donneur d'électron	NAD(P)H	NADPH
Localisation	Soluble	Membranaire
Transfert d'électrons	Flavoprotéine réductase (protéine fer-soufre : redoxine)	Flavoprotéine réductase (protéine fer-soufre, cytochrome b5)
Spécificité	Etroite	Etroite à large
Régulation	Inductible par substrats	Diverse, incluant inducibilité par les xénobiotiques
Phylogénie	Large	Tous les phyla majeurs

**Tableau 7 : Les cytochromes P450**

### *Les monooxygénases à Flavine (FMO)*

Les FMO ont été décrites pour la première fois comme le système responsable de l'oxydation des amines (amine oxydases) chez le foie de porc (Ziegler & Mitchell, 1972). Les études menées par Ziegler et ses collaborateurs ont joué un rôle majeur dans la compréhension de la chimie et de la biochimie de ces enzymes (Ziegler, 1988, 1990).

Les FMO catalysent des réaction de N-oxydation ou S-oxydation sur des substrats de type amines aliphatiques, amines secondaires ou tertiaires aromatiques, sulfides, thiols, phosphines et autres substrats potentiels. Un certain nombre d'amines aromatiques procancérogènes, en particulier, le 2-acétylaminofluorène (AAF), sont activées en composés cancérogènes par N-hydroxylation via le système FMO. L'AAF peut être également N-hydroxylé et activé par les cytochromes P450. Les caractéristiques et propriétés des FMO ont fait l'objet d'une revue récente par Schlenk (1993).

Chez les poissons, l'existence de réactions de N-oxydation telles que celles catalysées par les FMO, a été mise en évidence dès que la biotransformation de la triméthylamine (TMA) en triméthylamine oxyde (TMAO) a été connue. Certains auteurs ont avancé l'hypothèse que des substrats endogènes tels que la cystéamine ou la TMA étaient les "vrais" substrats des FMO. Cependant l'abondance des sulfides générés dans l'environnement marin (sédiments et autres systèmes) pourraient avoir exercé une pression écologique sur le développement de ces enzymes chez les espèces aquatiques. Les tests immunologiques de reconnaissance croisée suggèrent chez les poissons la présence de protéines structurellement apparentées aux FMO des mammifères. Il reste cependant à connaître l'identité, le nombre, les fonctions, les interactions et le mécanisme de régulation de ces enzymes.

### *Les cytochromes P450*

Omura & Sato ont réussi à identifier en 1964 le pigment particulier capable de fixer le monoxyde de carbone (CO) qui avait été mis en évidence dans les années précédentes dans le foie de rat : ils l'ont caractérisé comme étant une protéine hémique, un cytochrome de type b, et l'ont nommé "P450" en référence au pic d'absorption à 450 nm caractéristique de la forme réduite du cytochrome ayant fixé CO (Pigment 450). Simultanément, Estabrook *et al* (1963) ont montré que ces pigments possédaient une activité catalytique en prouvant leur implication dans l'hydroxylation des stéroïdes.

Les P450s existent chez les procaryotes et les eucaryotes où ils sont présents sous forme soluble et membranaire respectivement. Ils sont impliqués dans la biotransformation de composés endogènes et exogènes (xénobiotiques). Chez les

animaux, les P450s participent notamment à la synthèse et à la dégradation des stéroïdes, des prostaglandines et des acides gras. Les réactions qu'ils catalysent sont principalement des réactions d'oxydation : hydroxylation, époxydation, désalkylation et autres types de réactions oxydatives (**Tableau 8**).

Les P450s jouent un rôle clef dans la biotransformation des drogues, des composés chimiques industriels (pesticides, intermédiaires synthétiques et sous-produits), des composés naturels d'origine non-animale (plantes, champignons), et de ce fait, participent à leur toxicologie et leur excrétion (Ortiz de Montellano, 1986; Gonzalez, 1989; Ioannides & Parke, 1990).

---

Hydroxylation aromatique (benzo[a]pyrène)
Hydroxylation aliphatique (n-hexane)
Epoxydation (aflatoxine B <sub>1</sub> , acide arachidonique)
N-désalkylation (aminopyrine, étylmorphine)
O-désalkylation (7-éthoxyrésorufine)
S-désalkylation (methylmercaptan)
N-oxydation (aniline, amphetamine)
S-oxydation (aldicarbe)
P-oxydation (parathion)
Désulfuration (parathion)
Désamination oxydative (arginine)
Déshalogénéation oxydative (halothane)
Déshalogénéation réductrice (hexachlorobenzène, tétrachlorure de carbone)

---

**Tableau 8** : Types de réactions catalysées par les cytochromes P450 et substrats représentatifs (d'après Stegeman & Hahn, 1994).

### La famille multigénique des P450s

En 1991, plus de 100 gènes codant pour les cytochromes P450 ou P450 eux-mêmes appartenant aux procaryotes et aux eucaryotes avaient été séquencés et organisés en 27 familles géniques (Nebert *et al*, 1991). Depuis, le nombre d'ADNc ou protéines séquencés est passé à plus de 220 et la classification s'est élargie à plus de 36 familles géniques formant ainsi une superfamille multigénique (Nelson *et al*, 1993).

Les différents gènes sont désignés par CYP, suivi des symboles indiquant la famille génique (nombre arabe), la sous-famille (lettre capitale) et le numéro du gène (nombre arabe). Le nombre de gènes P450 propre à chaque espèce n'est pas connu, cependant on estime que chez les mammifères le nombre de gènes distincts, codant pour les P450s serait supérieur à 100.

### Le cycle catalytique des P450s

Le cycle catalytique des cytochromes P450 a été largement étudié dans les années passées, en particulier sur la forme bactérienne P450cam (P450 bactérien métabolisant le camphre). La présence de séquences hautement conservées dans les régions fonctionnelles des P450s bactériens et eucaryotes suggère des similitudes dans leur mécanisme catalytique (Guengerich & Mac Donald, 1990; Poulos & Ragg, 1992).

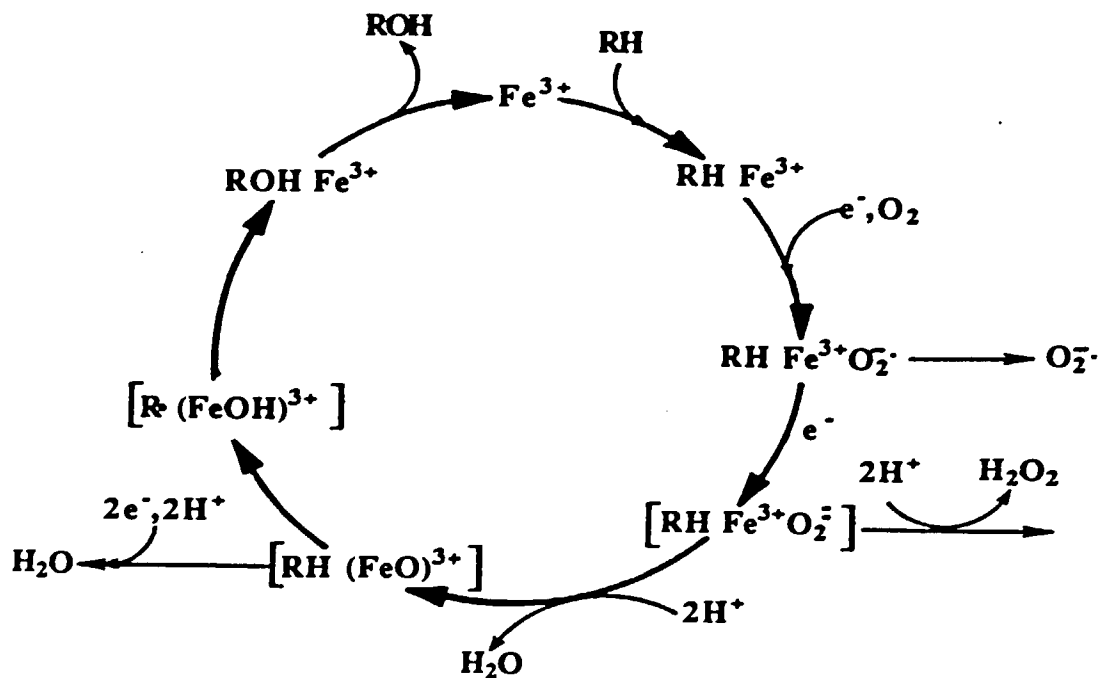


Figure 4 : Le cycle catalytique des cytochromes P450 (Poulos & Ragg, 1992).

### Les cytochromes P450 chez les espèces aquatiques

La structure et la fonction de P450s microsomaux ont été largement étudiées chez les mammifères, principalement dans le foie. Chez les espèces aquatiques, poissons et invertébrés notamment, les systèmes P450 microsomaux ont été décrits de façon détaillée au début des années 80 (Bend & James, 1978; Stegeman, 1981; Lech *et al*, 1982 ; Lee, 1982). Le premier cytochrome P4501A appartenant à une espèce aquatique a été purifié à partir de la truite Arc-en-Ciel en 1982 (Williams & Buhler, 1982), les anticorps monoclonaux spécifiques de cette forme obtenus en 1986 (Park *et al*, 1986) et l'ADNc correspondant séquencé en 1988.

Chez les poissons, le métabolisme des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) est rapide et fortement inductible par les HAP eux-mêmes (vitesse de métabolisation *in vitro* supérieure à 2 nmoles/min/mg pour le benzo[a]pyrène), au contraire des hydrocarbures aromatiques halogénés tels que les PCB, et les dioxines qui sont métabolisés lentement.

Chez les invertébrés les vitesses de métabolisation par les P450s sont en général plus faibles que chez les vertébrés. Ainsi le métabolisme des HAP détecté *in vitro* dans les tissus de mollusques est 2 à 3 fois plus lent que celui détecté dans des préparations de foie de poissons téléostéens.

L'inductibilité des cytochromes P450 par leurs propres substrats et par les composés structurellement apparentés à leurs substrats a été démontrée chez les poissons dans les 15 dernières années (Payne *et al*, 1987; Kleinow *et al*, 1987). L'induction est un processus par lequel un composé est capable d'augmenter la quantité des P450s, ceci implique généralement la synthèse de nouveaux ARN messagers et donc de nouvelles molécules protéiques. Le phénomène d'induction peut être détecté soit en mesurant l'augmentation d'une activité catalytique P450 dépendante, soit en mettant en évidence l'accroissement de la teneur en protéine ou en ARN messager correspondants. Ainsi un grand nombre d'hydrocarbures ont été évalués comme inducteurs du gène CYP1A chez les poissons (Tableau 9). Parmi les HAP, le benzo[a]pyrène, le diméthylbenzanthracène et le 3-méthycholanthrène sont inducteurs des P4501A, alors que les hydrocarbures aliphatiques (isooctane) et les hydrocarbures aromatiques de petite taille (benzène, naphtalène, phénanthrène) ne le sont pas. Pour les hydrocarbures aromatiques chlorés, l'induction des P4501A dépend de la configuration (planaire ou non) de la molécule ainsi que de la nature des substitutions latérales. L'induction des P4501A par les composés de la famille des dioxines a été récemment mise en évidence chez les poissons plats de la Mer du Nord (Eggens, 1995). Deux activités catalytiques caractéristiques : l'éthoxyrésorufine-o-deethylase (EROD) et l'aryl hydrocarbure (benzo[a]pyrène)

hydroxylase (AHH) sont associées au P4501A et permettent d'évaluer son induction (Tableau 10). Ainsi, l'induction de l'activité AHH chez les poissons a-t-elle été mise en évidence dès 1975 par Payne & Penrose.

Des études d'induction utilisant les 3 méthodes d'analyses décrites dans la Table 10 ont été effectuées chez diverses espèces de poissons, en particulier la truite Arc-en-Ciel, le saumon doré et le fondule (Haasch *et al*, 1989; Kloepper-Sams & Stegeman, 1989). En plus du foie, l'induction des P4501A intervient chez les poissons dans des organes extra-hépatiques tels que : ouïes, reins, intestins et coeur (Stegeman, 1989).

Les expérimentations *in vitro* sur cultures primaires d'hépatocytes de poissons ont permis tout à la fois d'étudier la fonction, la régulation et l'induction des gènes CYP1A (Miller *et al*, 1989; Stegeman *et al*, 1993; Pesonen & Andersson, 1991).



Composé	Méthode		
	Activité	Protéine	ARNm
β-naphthoflavone	+	+	+
3-Méthylcholanthrène	+	+	+
Benzo(a)pyrène	+	+	
Benzanthrène	+		
Dibenzanthracène	+		
Diméthylbenzanthrène	+		
Naphthalène	-		
Phénanthrène	-	-	
Pyrène	-		
Benzène	-		
Xylène	-		
Dibenzothiophène	-		
Isocane	-		
Chrysène	-		
Fluoranthène	-		
1,2,4-Triméthyl-naphthalène	-		
Mélange PCB	+		
3,3',4,4'-TCB	+	+	+
3,3',4,4',5-PCB	+	+	
3,3',4,4',5,5'-HCB	+	+	
2,3,3',4,4'-PCB	-	-	-
2,3',4,4',5-PCB	-/+	-/+	-
2,2',3,3',4,4'-HCB	-		
2,2',3,4,4',5'-HCB	-	-	-
2,2',4,4',5,5'-HCB	-		-
2,2',4,4'-TCB	-		
2,3,7,8-TCDD	+		
2,3,7,8-TCDF	+	+	+
2,3,6,8-TCDF	-	-	-
2,3,4,7,8-PCDF	+		
p,p'-DDT	-		
p,p'-DDE	-		
Pregnenolone-16α-carbonitrile	-	-	
Isosafrole	+	+	
Piperonyl butoxide	+		
Mirex	-		
Kepone	-		
Acrylamide	-	-	
Phénylbutazone	-		
Phénobarbital	-	-	
Indole-3-carbinol	-	-	

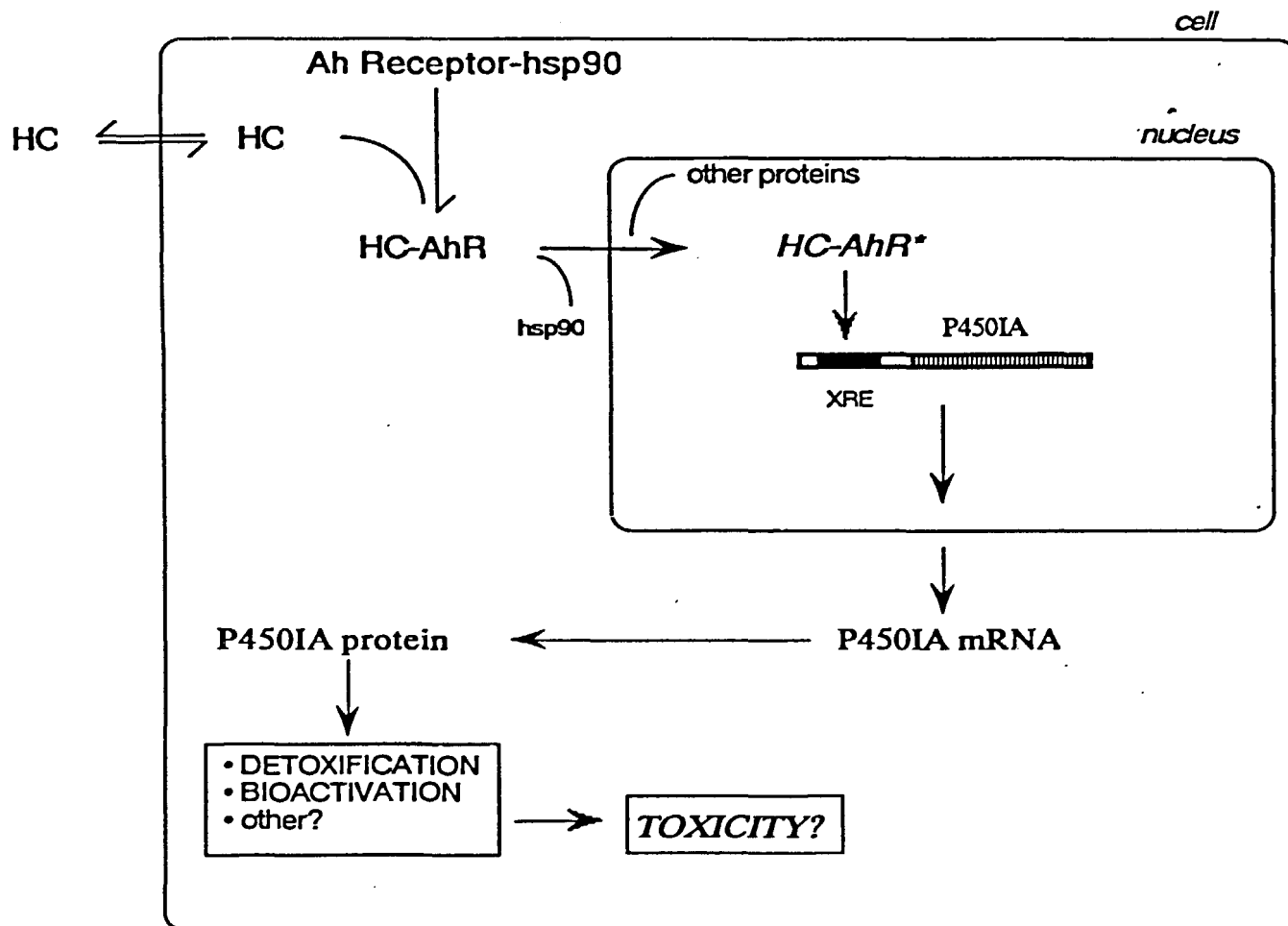
Note : DDT, dichlorodiphényltrichloroéthane ; HCB, hexachlorobiphényle, PCB, pentachlorobiphényle, TCB, tétrachlorobiphényle, TCDD, tétrachlorodibenzo-p-dioxine, TCDF, tétrachlorodibenzofurane

**Tableau 9** : Hydrocarbures évalués comme inducteurs du gène CYP1A chez les poissons. (Stegeman & Hahn, 1994).

Processus	Mesure	Sondes spécifiques	Essais
Réaction enzymatique	Vitesse de catalyse	Substrats : Ethoxyrésorufine benzo[a]pyrène	EROD (fluorimétrie, spectrophotométrie) AHH (fluorimétrie, radiométrie)
Traduction (synthèse des protéines)	Concentration en protéines	Anticorps monoclonaux ou polyclonaux	Western blot, Dot ou Slot blot, Elisa, immunohistochimie
Transcription (synthèse des ARNm)	Concentration en ARNm	Sondes DNA : cDNA, oligonucléotides	Dot blot, Slot blot, Northern blot

**Tableau 10** : Méthodes d'analyses pour l'induction des P4501A (d'après Stegeman *et al*, 1992).

Les composés qui sont inducteurs des P4501A chez les poissons étant également inducteurs des P4501A chez les mammifères, font suggérer que les mécanismes qui régissent l'induction chez ces 2 espèces présentent des similitudes. Chez les mammifères le mécanisme d'induction des P4501A fonctionne par un système de type récepteur, dans lequel le composé chimique inducteur active un récepteur spécifique en se liant à lui : ce récepteur appelé Ah (Aromatic hydrocarbon) est un facteur de transcription qui va pouvoir agir sur la transcription de l'ADN en ARNm (Landers & Bunce, 1991; Figure 5). L'existence de récepteurs Ah chez les poissons a été mise en évidence chez quelques espèces (Tableau 11).



**Figure 5 :** Mécanisme de l'induction des P4501A. L'inducteur (HC) pénètre la cellule, se lie au récepteur (AhR) qui est activé et pénètre le noyau. Le complexe récepteur-inducteur se lie aux séquences régulatrices de l'ADN (XRE) stimulant la transcription des ARNm P4501A. Le message est traduit en apoenzyme, l'insertion de l'hème rend l'enzyme active (Stegeman & Hahn, 1994).

---

**Groupe/espèce**


---

**Mammifères**dauphin (*Delphinapterus leucas*)**Reptiles**Tortue (*Chrysemis picta*)**Amphibiens**Triton (*Pleurodeles waltl*)**Poissons**Truite Arc-en-Ciel (*Oncorhynchus mykiss*)Truite brune (*Salmo trutta*)Fondule (*Fundulus heteroclitus*)Plie rouge (*Pleuronectes americanus*)Spare doré (*Stenotomus chrysops*)Chien de mer (*Mustelus canis*)Chien de mer (*Squalus acanthias*)**Lignées cellulaires de poissons**

RTH-149 (hépatome de truite Arc-en-Ciel)

RTG-2 (gonade de truite Arc-en-ciel)

PLHC-1 (hépatome de *Poeciliopsis lucida*)

---

**Tableau 11** : Espèces aquatiques chez lesquelles le récepteur Ah a été détecté  
(d'après Stegeman & Hahn, 1994)

Concernant les invertébrés marins, un certain nombre de revues ont décrit les propriétés du système MFO (Lee, 1982; Livingstone, 1989, 1991; James, 1989). Le niveau en P450s totaux chez certaines espèces est comparable à celui trouvé chez certains poissons téléostéens. Les enzymes microsomaux catalysent la biotransformation des xénobiotiques, dont les hydrocarbures aromatiques, mais à une vitesse substantiellement plus faible que chez les poissons. Il semble que l'induction par les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les hydrocarbures chlorés s'amorce chez les mollusques et les crustacés après plusieurs semaines de traitement (Schlenk & Buhler, 1989). Cependant l'existence de récepteurs Ah chez les invertébrés reste à prouver (Hahn *et al*, 1991).

### La diversité des P450s chez les espèces aquatiques

Les P450s ont été étudiés chez les vertébrés et invertébrés et notamment chez des espèces de poissons appartenant à plus de 10 familles différentes (Stegeman, 1989a). Les approches utilisées ont été de 3 types :

- purification de la protéine et caractérisation (séquençage des acides aminés)
- caractérisation immunologique
- clonage et hybridation avec sondes nucléiques

L'utilisation conjointe de ces 3 approches permet d'obtenir une information plus complète sur la structure, la fonction et la régulation des P450s. Le **Tableau 12** récapitule les formes de P450 qui ont été purifiées à partir de poissons : ce sont des membres des familles (sous-familles) 1 (A), 2 (B, E, K), 3 (A), 4 (A), 11 (A), 17 et 19 (Stegeman, 1993).

L'espèce la plus étudiée a été la truite Arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) en plus du sparc doré, du cabillaud et de la perche.

Les 3 formes hépatiques inductibles par les HAP et les hydrocarbures aromatiques chlorés plans les plus étudiés jusqu'à aujourd'hui sont le P450E du sparc doré, le P450 LM<sub>4b</sub>' de la truite et le P450c du cabillaud. Ces formes font partie de la famille génique des P450 inductibles par les HAP, la famille P4501 (Nebert *et al*, 1987; Stegeman, 1989b, 1992). Récemment, 2 formes P450 ont été purifiées par Anderson (1992) à partir de reins de truite Arc-en-ciel.

Chez les mammifères, la caractérisation fonctionnelle des séquences d'ADNc P450 clonées, par expression dans des systèmes hétérologues tels que les bactéries, levures ou cellules en culture a été réalisée pour plusieurs P450s (Langenbach *et al*, 1992). Chez les espèces aquatiques celle-ci a été réalisée pour 3 séquences : CYP11A (P450<sub>scc</sub>) (Takahashi *et al*, 1993), CYP19 (aromatase) (Tanaka *et al*, 1992) et CYP17 (17 $\alpha$ -hydroxylase) (Sakai *et al*, 1992). Une caractérisation complète des gènes P450 d'origine aquatique – purification, obtention d'anticorps, détermination de la fonction catalytique et clonage – a, d'autre part, été réalisée pour CYP1A1 et CYP2K.

**Tableau 12 : P450s purifiés à partir d'espèces aquatiques (d'après Stegeman & Hahn, 1994)**

Espèce/P450 forme	Protéine purifiée ou clonée	P450 famille/sous famille	Régulation	Tissu
Truite Arc-en-ciel (traitée au BNF)				
P450LM1	Protéine		foie	
P450 LM2	Séquence clonée	2K	mâle > femelle	foie, rein
P450 LM3	Protéine		foie	
P450 LM4b	Séquence clonée	1A1	induit par HAP, HAH	foie, rein
P450DS-1	Protéine		foie	
P450DS-2	Protéine		foie	
P450DS-3	Protéine		foie	
Truite Arc-en-ciel (non traitée)				
P450LMC1	Protéine 2B		foie	
P450LMC2 (=LM2)	Séquence clonée	2K	foie	
P450LMC3	Protéine		foie	
P450LMC4	Protéine		foie	
P450LMC5	Protéine 3A ?		mâle > femelle	foie, rein
P450con	Protéine 3A?		mâle > femelle induit par cortisol, PCN	foie, rein, intestin
P450KM1	Protéine		rein	
P450KM2	Protéine		mâle spécifique induit par androgènes	
P450scc	Séquence clonée	11		ovaire
P450arom	Séquence clonée	19		ovaire
P450c17	Séquence clonée	17		ovaire

Spare dor (sauvage)	Protine	3A?	Induit par HAP	foie
P450A	Protine	2B		foie
P450B	Protine			foie
P450C	Protine			foie
P450D	Protine	1A1		foie, rein, intestin
P450E				pithlium nasal, endothlium
Cabillaud (trait au BNF)	Protine			foie
P450a	Protine			foie
P450b	Protine			foie, rein
P450c	Protine	1A		foie
P450d				
Perche (traite au BNF)	Protine			foie
P450I	Protine			foie
P450II	Protine			foie
P450III	Protine			foie
P450IV	Protine	1A ?	foie	
P450V				
Plie	Squence clone	1A1	foie	
Raie hrisson (traite au DBA)				
P450 DBA-I	Protine	1A ?	foie	
P450 DBA-II	Protine		foie	
Homard				
P450 D1	Squence clone	?	hpatopancras	
P450D2	Protine		hpatopancras	
Moule	Protine		glande digestive	
Limace de mer	Squence clone	10	partie dorsale	

Notes : BNF,  $\beta$ -naphthoflavone ; HAP, hydrocarbures aromatiques polycycliques ; HAH, hydrocarbures aromatiques halogens ; DBA, dibenzanthracne

### La régulation de l'expression des gènes P450

Chez les mammifères cette régulation fait appel à des mécanismes qui agissent au niveau de la transcription, de la traduction ou de la post-traduction. Les vitesses de synthèse et de dégradation (turn-over) de l'hème, et de l'apoprotéines vont déterminer la quantité de P450s actifs. Il semble que chez les espèces aquatiques les mêmes systèmes de régulation soient impliqués dans la régulation de l'expression des P450s.

### La bioactivation des cancérrogènes par les P450s

Les études menées chez les poissons (Stegeman *et al*, 1982; Varanasi & Gmur, 1980; Varanasi *et al*, 1987) ont montré que des composés tels que le benzo[a]pyrène étaient activés en composés cancérrogènes par les P450s de la famille 1A. Les formes CYP2E sont soupçonnées d'activer les alkyl nitrosamines (Kaplan *et al*, 1991) et il a été prouvé que chez la truite, le P450LM2 (CY2K1) active l'aflatoxine B1 en dérivé toxique 2,3-époxyde (Williams & Buhler, 1983; Goeger *et al*, 1988).

Chez les invertébrés, et plus particulièrement les mollusques, une activité de type P4501A est suggérée par les travaux récents de Wootton *et al* (1993) chez la moule *Mytilus edulis* et confirmerait donc l'activation du benzo[a]pyrène en composé mutagène observée précédemment (Michel, 1992).

Les métabolites issus de la transformation des xénobiotiques peuvent s'accumuler dans les tissus : vésicule biliaire, foie, reins, intestin, muscle, tissu nerveux chez le poisson ; gland digestive/hepatopancréas, muscle et tissu nerveux chez les invertébrés. Leur liaison covalente aux macromolécules biologiques (ADN, ARN, protéines) est considérée comme une étape potentielle d'initiation des processus toxicologiques tels que la mutagénèse, la cancérogénèse et la nécrose cellulaire (Miller & Miller, 1985). La formation d'adduits HAP-ADN a été rapportée dans des systèmes biologiques divers (Philip & Sims, 1979). Chez les poissons la formation de ces adduits a été démontrée en laboratoire après exposition aux HAP et *in situ* chez des espèces issues de zones contaminées (Shugart *et al*, 1987; Varanasi *et al*, 1989b; Sikka *et al*, 1990).

### L'induction des P450s comme biomarqueur de pollution chez les espèces aquatiques

L'induction de l'activité arylhydrocarbure hydroxylase (AHH) P-450 dépendante a été proposée comme marqueur d'exposition au pétrole dans les



années 70 (Payne J.F., 1976). En 1984, la première induction environnementale a été observée chez des larves de saumons issues de zones contaminées des grands lacs aux USA (Binder R.L. & Lech J.J., 1984). L'analyse de l'induction par immunotest avec des anticorps antiP4501A a été réalisée en 1986 (Stegeman J.J. *et al.*, 1986) et l'utilisation de la détection des ARNm suggérée en 1989 (Haasch M.L. *et al.*, 1989 ; 1993).

### 2-2-2- L'acétylcholinestérase

L'AChE est responsable de l'hydrolyse de l'acétylcholine en choline et acide acétique (O'Brien, 1967). Chez les vertébrés l'AChE est vitale pour assurer un fonctionnement neuronal normal des systèmes sensoriel et neuromusculaire, notamment. La mesure de cette activité dans le sang et les tissus est utilisée pour l'évaluation de l'exposition aux composés organo-phosphorés et aux carbamates (pesticides, gazs) chez l'homme et comme outil de diagnostic dans le milieu médical.

Chez les salmonidés, l'inhibition de l'AChE altère la respiration, l'activité natatoire (nage), la nutrition. Chez les invertébrés les inhibiteurs de l'AChE sont léthaux et ont des effets au niveau de l'ensemble de la population.

### 2-2-3- L'acide $\delta$ -aminolevulinique deshydratase ( $\Delta$ -ALAD)

La  $\Delta$ -ALAD est une enzyme présente dans de nombreux tissus et active dans la synthèse de l'hémoglobine en catalysant la formation de phosphobilinogène, un précurseur de l'hème (Hammond & Belile, 1980). L'exposition au plomb provoque une baisse dose-dépendante de l'activité ALAD des erythrocytes chez les oiseaux, les mammifères et les poissons par inhibition directe de l'enzyme (Johansson-Sjoberg & Larsson, 1979; Haux *et al.*, 1986). L'enzyme étant inhibée avant l'apparition des signes de toxicité, l'ALAD est plutôt un biomarqueur d'exposition que de toxicité (au plomb).

#### 2-2-4- Les métallothionéines

Les métallothionéines (MT) sont des protéines fixatrices de métaux de faible masse molaire (6-8 DKa chez les mammifères) présentes chez les vertébrés, les invertébrés et les microorganismes (Kägi & Nordberg, 1979, 1987). Il a été démontré que les MT sont inductibles par exposition à des éléments toxiques tels que le cadmium, le platine, l'or et le mercure. Ainsi chez le rat et la souris une augmentation de la teneur en MT dose-dépendante a été observée par exposition au cadmium (Kotsonis & Klaassen, 1978; Boer & Benson, 1987). L'induction des MT (ou de protéines apparentées aux MT) après exposition aux métaux a également été observée chez la truite, la plie, la moule, le clam et la coquille St-Jacques (Roesijadi & Spies, 1988). Dans les tissus de poissons téléostéens, la corrélation entre la teneur en MT et la concentration en métaux a été démontrée (Kito *et al*, 1982; Hamilton & Mehrle, 1986).

Des méthodes de détection et de quantification des MT dans les fluides biologiques et le cytosol des mammifères ont été développées telles que les radioimmunoessais (RIA) et les tests ELISA qui sont basés sur l'utilisation d'anticorps polyclonaux et monoclonaux dirigés contre les protéines MT. L'immunocytochimie permet, d'autre part, des essais de localisation des MT sur des coupes de tissu ou de cellules.

Les métallothionéines du foie présentent une plus grande spécificité vis-à-vis des métaux que les MT des autres tissus et semblent prometteuses comme biomarqueurs d'exposition aux métaux dans l'environnement. Il faut cependant tenir compte dans cette évaluation de 2 paramètres physiologiques qui peuvent influencer sur la teneur en MT : la maturation sexuelle et l'état nutritionnel de l'animal. Chez la truite Arc-en-Ciel Olsson *et al* (1987) ont ainsi observé des variations de la teneur en MT durant son cycle de reproduction annuel.

#### 2-3 Les marqueurs de génotoxicité

L'exposition d'un organisme à des composés chimiques génotoxiques peut induire l'apparition en cascade d'une série d'événements génétiques : altération de la structure de l'ADN, expression de dommages subis par la synthèse de produits géniques mutants, pathologies associées à ces dommages. La détection et la quantification de certains de ces

événements permettent de les considérer comme des biomarqueurs d'exposition et d'effets chez les organismes exposés aux agents génotoxiques dans l'environnement.

Les méthodes développées pour évaluer la génotoxicité des composés chimiques sont basées sur la mesure directe ou indirecte :

- des altérations de structure de l'ADN
- de l'activité réparatrice de l'ADN (capacité de l'ADN à réparer les altérations de structure subies
- des mutations apparues dans l'ADN

Elles consistent pour les plus courantes à évaluer les aberrations chromosomiques (cassure des brins d'ADN, formation de micronuclei), les distributions anormales de l'ADN dans les cellules, les adduits à l'ADN et les mutations. L'activation des oncogènes et l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs constituent 2 axes de recherche qui sont appelés à se développer fortement dans les années futures.

L'évaluation de l'intégrité de l'ADN a été proposée en 1987 aux Etats-Unis comme biomarqueur des propriétés génotoxiques des polluants (Committee on Biological Markers of the National Research Council, 1987).

Aux marqueurs cités plus haut peuvent être associés des marqueurs biochimiques spécifiques de l'expression d'un gène particulier. L'hybridation *in situ* permet par exemple d'indiquer les lésions dans lesquelles les cellules expriment l'oncogène ras (ou d'autres oncogènes). Moore and Evans (1992) ont ainsi utilisé une réaction immunohistochimique, dans laquelle le peptide N-terminal de la protéine N-ras était détecté, qui leur a permis de révéler la présence de foyers d'hépatocytes altérés dans les foies de limandes (*Limanda limanda*) issues d'une zone polluée de la mer du Nord.

D'autres gènes importants, tels que les gènes de la famille p53, qui jouent un rôle dans le contrôle de la croissance et de la différenciation cellulaire et qui présentent des mutations durant la cancérogénèse chez l'homme (Hollstein *et al.*, 1991), pourraient permettre d'obtenir de tels marqueurs.

### 2-3-1- Les aberrations chromosomiques

La dénaturation alcaline de l'ADN est une méthode analytique sensible qui permet de détecter et de quantifier les cassures des brins d'ADN induites par les composés cancérogènes (Daniel *et al.*, 1985). Ce test a été mis au point au début des années 80 sur des cellules en culture (Ahnstrom and Erixon, 1980; Kanter and Schwartz, 1982).

La formation de micronuclei constitue une autre forme d'aberrations chromosomiques (Schmidt, 1976). La formation de micronoyaux résulte de la fragmentation de chromosomes qui ne sont pas incorporés dans le noyau de la cellule fille au moment de

la mitose. Les fragments de chromosomes sont rassemblés sous la forme d'une petite masse intracytoplasmique de chromatine.

Un test micronoyau a été normalisé par l'AFNOR en 1992 (T-90-325, test Jaylet) pour l'évaluation de la genotoxicité en eau douce chez le triton Pleurodèle (*Pleurodeles walt*).

Un autre test micronoyau a récemment été mis au point pour les eaux douces avec le têtard du xénope (*Xenopus laevis*) (Agences de l'eau, 1996).

Hose *et al* (1987) pour leur part détecté une fréquence élevée de micronuclei dans les érythrocytes de 2 espèces de poissons marins issus de zones polluées. La recherche de micronuclei a également fait l'objet de travaux chez la moule (Wrisberg, 1990).

### 2-3-2 Les adduits à l'ADN

Les altérations de l'ADN dues à la formation d'adduits apparaissent lorsque certains mécanismes de détoxification visant à détoxifier un xénobiotique sont incomplets et génèrent des métabolites électrophiles hautement réactifs vis à vis des macromolécules cellulaires nucléophiles (protéines, ADN, ARN). La formation d'adduits à l'ADN est un événement important des phases d'initiation et promotion du processus de cancérogénèse, et peut jouer un rôle dans les étapes ultérieures de ce processus (Miller and Miller, 1981; Harris, 1985, 1991; Lutz, 1990).

Il est ainsi considéré que n'importe quel composé chimique susceptible de se fixer à l'ADN et de former un adduit, même en faible quantité, est potentiellement mutagène et cancérogène (DE Serres, 1988).

#### *Le rôle des adduits dans le processus de cancérogénèse*

Dans le processus de cancérogénèse modèle, tel qu'il a été établi en laboratoire, on distingue les phases d'initiation, promotion, conversion et progression. Dans la 1ère phase, la phase d'initiation, l'exposition à un cancérogène et son interaction avec l'ADN induit des altérations de l'ADN dans certaines cellules. Ces altérations peuvent intervenir dans des cellules qui ne se divisent pas et avoir, alors, peu de conséquences ultérieures. Par contre, si les cellules se divisent avec des altérations non réparées ou réparées incorrectement, les cellules deviennent des cellules initiées. Dans la phase de promotion, les cellules initiées se développent anormalement et acquièrent une expansion de type clonal pendant laquelle elles sont particulièrement vulnérables à la survenue d'altérations génétiques supplémentaires. Enfin, durant la phase de progression, les cellules peuvent acquérir des caractéristiques phénotypiques altérées.

Les méthodes les plus couramment utilisées aujourd'hui (Shugart *et al*, 1992) pour la détection des adduits à l'ADN sont : le post-marquage au P32 (Gupta and Randerath, 1988), la chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplée à la

spectrophotométrie de fluorescence (Rahn *et al*, 1982), et les immunotests utilisant des anticorps polyclonaux reconnaissant spécifiquement les adduits. Des anticorps hautement spécifiques ont notamment été développés contre des ADN modifiés par fixation de groupements méthyl et ethyl, d'amines aromatiques, d'HAP, d'aflatoxine et de platine (Poirier, 1984; Santella, 1988).

La sensibilité de ces nouvelles méthodes qui n'utilisent plus de cancérogènes chimiques radioactifs est donnée dans le **Tableau 13**.

Méthode	Sensibilité*	DNA ( $\mu\text{g}$ )
CLHP/FL	1/10 <sup>7</sup>	100
CG-MS	1/10 <sup>5</sup>	< 1
Post-marquage P <sup>32</sup>	1/10 <sup>9</sup>	1-10
Immunochimie	1/10 <sup>7</sup>	1

\* sensibilité = adduits/nucléotides normaux

Note : CLHP/FL = chromatographie liquide haute performance/fluorescence, CG-MS = chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse.

**Tableau 13** : Méthodes sensibles utilisées pour détecter les adduits à l'ADN chez le poisson.  
D'après A. Maccubin, in *Aquatic Toxicology*, Lewis Publishers, 1994, p. 273.

La formation d'adduits à l'ADN chez les poissons a été largement étudiée comme phase d'initiation potentielle par les composés chimiques génotoxiques. L'interaction des composés chimiques avec l'ADN a été mise en évidence dans les années 70 en utilisant des composés radioactifs (Baird, 1979). Des adduits résultants de la fixation du benzo[a]pyrène à l'ADN cellulaire de poisson ont été identifiés et quantifiés en laboratoire (Shugart *et al*, 1987). Dunn *et al* (1987) ont pour leur part mis en évidence des adduits cancérogènes à l'ADN chez des poissons sauvages issus de zones polluées. La persistance des adduits a également été étudiée et les résultats obtenus montrent que, de façon générale, l'activité enzymatique de réparation de l'ADN (élimination des adduits) est faible chez les poissons (Fong *et al*, 1988). Il a été ainsi suggéré que la mesure des adduits à l'ADN pouvait constituer un biomarqueur utile d'exposition et d'effets aux cancérogènes chez les poissons (Dunn, 1990).

### 2-3-3- Inhibition de la methylation de l'ADN

Un autre mode d'action des composés cancérigènes consiste en l'inactivation directe des méthyltransferases chargées de méthyler l'ADN. Une inhibition de cette activité de méthylation peut conduire à des zones d'ADN déprotégées et peut induire la dérégulation de l'expression de certains gènes (Cedar, 1988; Boehim & Drahovsky, 1983; Wilson & Jones, 1983; Pfeifer *et al*, 1984). Chez les eucaryotes la méthylation de l'ADN s'effectue en général sur la 5-desoxycytidine et le système enzymatique des méthyltransferases maintient ce desoxyribonucleoside méthylé (Razin and Riggs, 1980; Erlich & Yang, 1981; Holliday, 1987). Une hypométhylation de l'ADN mesurée par une baisse de la teneur en 5-méthyl-desoxycytidine a été récemment observée chez les poissons exposés au benzo[a]pyrène (Shugart, 1990).

### 2-3-4- Les mutations

Une des conséquences importante de l'exposition aux génotoxiques est l'apparition de mutations sur l'ADN amenant à l'altération des fonctions géniques. Plusieurs types de mutations ont été observées sur l'ADN de cellules traitées avec des cancérigènes chimiques : mutation point, translocation de gène et amplification de gène. Il est reconnu que 2 classes de gènes jouent un rôle important dans la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse : les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. Les oncogènes sont des gènes cellulaires normaux (proto-oncogènes) qui après avoir subi une transformation oncogénique se mettent à fonctionner anormalement ou à produire un produit protéique altéré (expression anormale). L'activation oncogénique ou oncogénèse est liée à la survenue d'événements particuliers sur le génome : des mutations telles que les délétions, les insertions, ou bien des réarrangements de la séquence nucléotidique tels que les translocations, inversions, amplification localisée de gène ou insertion virale (Goldberg, 1990). Ces processus sont impliqués dans l'acquisition d'un phénotype cellulaire malin.

Chez les animaux exposés aux cancérigènes chimiques les oncogènes les plus fréquemment détectés au niveau des tumeurs appartiennent à la famille c-ras (c-Ha-ras, c-Ki-ras et N-ras) (Bos, 1988). Le mécanisme d'activation de cette famille de gènes résulte d'une mutation point sur le domaine spécifique codant pour un polypeptide (Barbacid, 1987, Zarbl *et al*, 1985; Balmain and Brown, 1988). Les oncogènes, plus de 60 détectés à ce jour, ont été classés en différentes familles en fonction de la structure, la fonction et la localisation cellulaire de leur produit protéique. Les protéines pour lesquelles ils codent fonctionnent en tant que facteurs de croissance, récepteurs de facteurs de croissance, activateurs de transcription et autres molécules impliquées dans la

transmission de signaux cellulaires. Dans les cellules normales les oncogènes agissent comme des régulateurs positifs de la croissance et la différenciation cellulaire.

Les 4 classes d'oncogènes reconnues à ce jour sont :

classe I : les tyrosines kinases

classe II : les facteurs de croissance

classe III : les oncoprotéines nucléaires activateurs de transcription

classe IV : les oncoprotéines nucléaires à activité GTPasique

Au contraire des oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs agissent dans les cellules normales en tant que régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire. Plusieurs de ces gènes ont été d'ores et déjà isolés et caractérisés, ce sont les gènes : Rb (retinoblastoma), WT (Wilm's Tumor gene), p53, NM23 (metastasis suppressor gene), NF1 (neurofibromatosis type 1 gene), DCC (deleted in colon carcinoma gene), APC (adenomatous polyposis coli) et MCC (mutated in colorectal cancer). Il a été récemment montré que des mutations dans les gènes p53 et Rb entraînent l'inactivation des suppresseurs de tumeurs protéine p53 et protéine Rb.

En plus des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs, d'autres types de gènes pourraient être la cible privilégiée de mutations par les génotoxiques et être impliqués dans le processus de cancérogénèse (Loeb, 1991; Lohman *et al.*, 1987).

La technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) mise au point par Saiki *et al* (1988a) et qui utilise des oligonucléotides synthétiques comme amorces (primers) pour amplifier spécifiquement certaines séquences d'ADN, permet pratiquement d'envisager la recherche et l'identification des mutations sur les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. D'autres méthodes d'analyse telles que l'hybridation rapide (dot-blot) avec des sondes ADN non-radioactives (Saiki *et al*, 1988b), ou l'analyse du polymorphisme lié aux fragments de restriction (RFLP Restriction Fragment Length Polymorphism) (Kahn *et al*, 1990) ont été d'ores et déjà utilisées pour mettre en évidence l'existence de ces mutations dans des cellules tumorales.

Chez les poissons, les premiers oncogènes furent clonés et séquencés à partir du poisson rouge (Nemoto *et al*, 1986) et de la truite arc en ciel (Van Beneden *et al*, 1986) en 1986. Wirgin *et al* (1989a) et Mac Mahon (1990) ont, pour leur part, mis en évidence un fort pourcentage d'oncogènes c-Ki-ras activés dans des tumeurs du foie chez la plie sauvage et le poulamon issu de la rivière Hudson aux Etats-Unis. Les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs d'ores et déjà identifiés chez le poisson sont rassemblés en **Tableau 14**.

Oncogène	Espèce	Source
<i>myc</i> <i>ras</i>	Truite arc-en-ciel ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	foie, testicules
	Cyprin doré ( <i>Crassius auratus</i> )	foie
	Plie ( <i>Pseudopleuronectes americanus</i> )	Tumeurs du foie
	Poulamon atlantique ( <i>Microgadus tomcod</i> )	Tumeurs du foie,
	Truite arc-en-ciel ( <i>O. mykiss</i> )	Foie normal, foie néoplasique
<i>src</i>	Xiphophore	Tissus variés, mélanome
<i>erb-A</i>		Tissus variés, mélanome
<i>erb-B</i>		Tissus variés, mélanome
<i>Tu</i>		Mélanome
<i>yes</i>		Tissus variés
<i>fyn</i>		Tissus variés
<i>abl</i>	Poulamon atlantique ( <i>M. tomcod</i> )	Foie
<i>p53</i>	Truite arc-en-ciel ( <i>O. mykiss</i> )	Foie
<i>Rb</i>	Medaka ( <i>Oryzias latipes</i> )	Foie, oeil, cerveau, viscères
	Coelacanthe ( <i>Latimeria chalumnae</i> )	Foie
	Truite arc-en-ciel ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Hépatocytes, cerveau
	Sole ( <i>Parophrys vetulus</i> )	Foie
	Danio zébré ( <i>Brachiodanio rerio</i> )	Tissus variés
<i>Wnt-1</i>		
<i>Inconnu</i>	Medaka ( <i>Oryzias latipes</i> )	Cholangiocarcinome
<i>Inconnu</i>	Brochet ( <i>Esox lucius</i> )	Lymphosarcome

**Tableau 14 :** Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs identifiés chez les poissons. D'après Van Beneden, R.J. in *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, Hochachka, P.W. and Mommsen, T.P. Eds., Elsevier Press, Amsterdam, 1994.

### *Les oncogènes chez les poissons*

#### les oncogènes de classe I : les tyrosines kinases

Les oncogènes de classe I codent pour des tyrosines kinases qui peuvent avoir le rôle de récepteurs de facteurs de croissance. Ces protéines possèdent 2 propriétés importantes : elles sont membranaires et catalysent la phosphorylation des résidus tyrosine. Avant la découverte de cette classe de gènes, il était admis que la phosphorylation des protéines n'intervenait que sur les résidus serine et thréonine (Comoglio *et al*, 1990). Il semble que cette activité phosphorylante



particulière soit une caractéristique des gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire (Stoler, 1991).

- Tu ou complexe génique associé au mélanome du Xiphophore

Un des modèles de tumeur le plus étudié chez les poissons téléostéens est le mélanome héréditaire du Xiphophore, petit poisson d'eau douce rencontré en Amérique centrale (Ozato and Wakamatsu, 1983; Anders *et al*, 1984, 1985; Zechel *et al*, 1989; Schartl, 1990, Vielkin *et al*, 1989). Ce poisson a évolué en de nombreuses sous-espèces qui se caractérisent par une pigmentation unique constituée de trois types différents de cellules pigmentaires : les pterinophores, purinophores et melanophores (contenant de la mélanine). La première hypothèse émise par les chercheurs fut que la formation du mélanome était liée à une surexpression des gènes codant pour la mélanine. Les investigations ultérieures de Anders *et al* en 1967 ont conduit à proposer que le mélanome héréditaire du Xiphophore résultait de la perte du régulateur négatif d'un complexe génique tumoral (Tu). Ce complexe comprend notamment les gènes *egfr-B*, *erb-B* et *Xmrk* (Adam *et al*, 1988; Wittbrodt *et al*, 1989; Zechel *et al*, 1992). Chez l'homme l'oncogène *erb-B* code pour la forme tronquée d'une tyrosine kinase récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor) qui a perdu son domaine de liaison extracellulaire. Ce gène est amplifié et surexprimé dans un grand nombre de tumeurs notamment dans les carcinomes et les glioblastomes (Downward *et al*, 1984; Aaronson, 1991).

- src

Les gènes de la famille *src* codent pour des tyrosines kinases qui jouent un rôle dans la transformation cellulaire mais n'agissent pas comme des récepteurs.

- v-src

L'oncogène *v-src*, gène transformant du virus du sarcome de Rous (sarcome de la poule), a été le premier oncogène viral à être identifié (Cooper, 1990). Il code pour une tyrosine kinase de 60 KDa (*pp60c-src*). Une protéine apparentée à la *pp60c-src* a été localisée dans la peau, le foie, la bile et les testicules du Xiphophore et d'autres espèces de poissons (Barnekow *et al*, 1982).

- yes, fyn

Les gènes *yes* et *fyn* ont également été identifiés chez le Xiphophore (Hannig *et al*, 1991). Ils font partie de la famille *src*, codent également pour une tyrosine kinase de 60 KDa qui est associée à la surface interne de la membrane cellulaire (Semba *et al*, 1986).

- abl

Les gènes abl qui possèdent des similitudes de structure avec la famille src (Cooper, 1992) codent pour une tyrosine kinase non-récepteur, cependant la masse molaire de celle-ci est de 150 KDa. Chez l'homme, l'activation du gène abl dans les leucémies chroniques de la moelle osseuse s'effectue notamment par une translocation chromosomique qui altère la structure du gène et résulte en un accroissement de l'activité kinase qui lui est associée. Les gènes abl ont été identifiés dans le foie de poulamon atlantique par Wirgin *et al* (1990).

#### Les oncogènes de classe II : les facteurs de croissance

L'hypothèse, émise en 1977, que la surproduction d'un facteur de croissance par une cellule pouvait induire une prolifération cellulaire incontrôlée, a été confirmée par l'identification de l'oncoprotéine PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), produit de l'oncogène sis, comme facteur de croissance des fibroblastes (Cooper, 1990). Cette classe d'oncogènes inclue également les gènes int-2, hst et fgf-5. Cette classe d'oncogènes n'a pas encore été caractérisée chez les poissons.

#### Les oncogènes de classe III : Les oncoprotéines nucléaires activateurs de transcription

Chez les eucaryotes la transcription est contrôlée par l'interaction de protéines facteurs de transcription avec des séquences régulatrices spécifiques sur le génome. Les facteurs de transcription requièrent 2 domaines fonctionnels : un domaine de liaison à l'ADN, qui permet la liaison spécifique à la séquence régulatrice sur l'ADN, et un domaine actif qui permet une interaction protéine-protéine. La plupart des oncoprotéines identifiées au niveau du noyau cellulaire agissent comme activateurs de transcription. Les membres de cette famille d'oncogènes comprennent les gènes erb-A, jun, fos, myc, ets, myb, ski et rel. Seuls les gènes myc et erb-A ont été clonés chez les poissons téléostéens.

- myc

L'activation des oncogènes cellulaires myc : c-myc, L-myc et N-myc a été décrite dans une grande variété de néoplasmes (Ascione *et al*, 1986 ; Cole, 1986). Le processus d'activation de ces oncogènes intervient par translocation chromosomique, amplification de gène ou insertion provirale.

Le gène myc de la truite arc-en-ciel fut un des premiers oncogènes de poisson à être cloné et séquencé (Van Beneden *et al*, 1986).

- erb-A

Le gène erb-A fut identifié en 1986 comme le gène codant pour un récepteur à une hormone thyroïdienne agissant comme régulateur de transcription. Des mutations intervenant essentiellement sur le domaine du gène codant pour la partie carboxy-terminale de la protéine erb-A, empêche la liaison du récepteur à l'hormone thyroïdienne.

#### Les oncogènes de classe IV : les oncoprotéines nucléaires à activité GTPasique

- ras

Les gènes ras sont hautement conservés et ont été identifiés chez tous les eucaryotes étudiés, incluant les mammifères, les poissons, les mollusques, la drosophile, les plantes, les levures (Barbacid, 1987). Environ 20 à 30 % des tumeurs humaines examinées jusqu'à ce jour contiennent des gènes ras activés. La super-famille ras comprend aujourd'hui plus de 40 gènes classés en trois familles : ras, rho et rab (Downward, 1990). Seuls les gènes de la famille ras ont été étudiés chez les poissons.

Les gènes de la famille ras codent pour des protéines membranaires de faible masse molaire (21 KDa) impliquées dans la transmission des signaux cellulaires. Les mutations des gènes ras provoquent une diminution d'activité GTPasique des protéines ras, ce qui induit une augmentation de la quantité de ces protéines liées au GTP.

Le gène ras du poisson rouge (*Carassius auratus*) a été le premier oncogène cloné et séquencé chez les poissons en 1986 (Nemoto *et al*, 1986). L'étude de sa séquence a révélé de fortes homologues entre les gènes ras de poissons et de mammifères. Chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) 2 gènes ras désignés par ras-1 (c-Ki-ras) et ras-2 ont été identifiés et partiellement séquencés à partir de foie (Mangold *et al*, 1991). L'homologie de séquence avec les gènes ras humains se situe entre 76,8 et 87,1 %. La première étude expérimentale d'induction de mutations sur les gènes ras chez le poisson a été effectuée en 1991 (Chang *et al*, 1991) en exposant la truite arc-en-ciel à l'aflatoxine B1 (AFB1). L'AFB1 est une mycotoxine activée via le métabolisme en AFB1 8,9-époxyde capable de générer des adduits à l'ADN au niveau des bases Guanine (Muench *et al*, 1983). Sur les 14 tumeurs du foie induites par l'AFB1, 10 ont révélé une mutation point de l'exon 1 du gène ras-1. Chez la plie (*Pseudopleuronectes americanus* issue de zones contaminées par les HAP aux Etats-Unis et porteuse de carcinomes hépatocellulaires et cholangiocellulaires (Murchelano and Wolke, 1985), Mac Mahon *et al* (1990) ont mis en évidence l'activation de l'oncogène c-Ki-ras par

mutation point. Des travaux similaires ont été entrepris par Wirgin *et al* (1989b) sur le poulamon atlantique issu de la rivière Hudson.

### *Les gènes suppresseurs de tumeurs chez les poissons*

- Rb

Le gène suppresseur de tumeurs le plus étudié est le gène du retinoblastome *rb* (Weinberg, 1988; Den Otter *et al*, 1990). Pratiquement tous les retinoblastomes examinés jusqu'à aujourd'hui s'accompagnent de la perte ou d'une altération de l'expression du produit du gène Rb (p105Rb), une phosphoprotéine nucléaire qui a la capacité de se lier à l'ADN et de se complexer avec les protéines transformantes virales en les inactivant (Whyte *et al*, 1988).

Le gène Rb est largement distribué parmi les vertébrés : mammifères, amphibiens, reptiles, oiseaux (Berbards *et al*, 1989 ; Destree *et al*, 1992) et poissons. Le produit du gène Rb a été détecté notamment chez le medaka, la truite arc-en-ciel, la sole et le primitif coelacanthe. L'expression du gène a été mise en évidence dans pratiquement tous les tissus, avec la plus forte activité dans le cerveau, l'appareil gastro-intestinal et le foie. G.K. Ostrander a développé en 1992 un modèle d'induction chimique du retinoblastome chez les poissons en exposant le medaka au composé : le méthylazoxyméthanol acétate afin de détecter des altérations potentielles du gène Rb.

- p53

Le gène p53 est un des gènes les plus étudiés dans les modèles de cancérogénèse des mammifères. Le produit du gène p53 est une phosphoprotéine nucléaire de masse molaire voisine de 53 KDa. La comparaison des séquences en acides aminés des produits p53 chez l'humain, le singe, la souris, le rat, le poulet, le xénope et la truite arc-en-ciel a révélé 5 domaines hautement conservés (90 % d'homologie sur ces 5 domaines entre la truite arc-en-ciel et l'homme). L'évolution de la structure du gène a été récemment résumée par Soussi *et al* (1990).

## LA MISE EN PRATIQUE DE LA BIO-SURVEILLANCE

A partir des années 1970 et sous l'impulsion des pollutions pétrolières par naufrage et des craintes liées aux rejets industriels, l'écotoxicologie marine s'était donné pour objectifs d'évaluer les effets des polluants à court et moyen terme ainsi que leur transmission dans les chaînes alimentaires par dosage des polluants dans la matière vivante (bioaccumulation). Longtemps considérées comme relevant du domaine appliqué, les recherches ont été essentiellement conduites par un petit nombre d'équipes dispersées et aux moyens limités. Depuis 1985 des équipes de chimistes et biochimistes se sont regroupées pour étudier en laboratoire et in situ les mécanismes enzymatiques qui conduisent à la biotransformation des polluants, alors que d'autres abordaient les effets des polluants au niveau de multiples maillons trophiques reconstitués dans des microcosmes ou mésocosmes (tests d'écotoxicité). La majorité de ces recherches sont intégrées au niveau international et des orientations nouvelles apparaissent au plan prédictif avec les modèles de corrélation entre propriétés physiques des molécules et les effets sur les organismes (relation structure-activité) (Bourgoin et Alzieu, 1990).

### I- Les travaux du RNO

Le RNO a été mis en place en 1974 par le ministère de l'Environnement avec pour premier objectif l'évaluation des niveaux et des tendances des polluants chimiques et des paramètres généraux de la qualité du milieu marin.

#### 1- La surveillance des polluants

La matière vivante, et notamment les coquillages tels que la moule et l'huître, constituent un excellent support de mesure pour la surveillance des polluants.

Depuis 1979, à raison de quatre campagnes de prélèvements par an, une quantité considérable de données a été acquise par le RNO sur les teneurs en contaminants dans les huîtres et les moules du littoral français qui sont considérées comme organismes sentinelles. Les polluants chimiques systématiquement recherchés sont les métaux toxiques et les polluants organiques : cadmium (Cd), plomb (Pb), zinc (Zn), cuivre (Cu), polychlorobiphényles (PCB), DDT, DDD, DDE, lindane ( $\beta$ -HCH),  $\alpha$ -HCH, hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Une centaine de stations sur 43 sites du littoral sont échantillonnées 4 fois par an par les agents IFREMER (Travaux du RNO, 1988 à 1995). En complément à ce programme principal, et pour satisfaire notamment aux obligations internationales de la France, la surveillance des polluants s'effectue aussi dans le poisson (baie de Seine et Marseille) ainsi que dans les

sédiments. Les polluants recherchés sont les mêmes que dans la matière vivante, accompagnés des paramètres descriptifs et normalisateurs propres à cette matrice, tels que granulométrie, carbone organique, carbonates, perte au feu, aluminium, fer, lithium, manganèse.

## 2- La surveillance des effets biologiques

La surveillance des effets biologiques vise à évaluer l'état de santé de la flore et de la faune marines par la mesure de la réponse de ces organismes à des perturbations de la qualité du milieu. Elle peut mettre en oeuvre les techniques biologiques classiques mais aussi la pathologie, la physiologie, la biochimie.

En ce qui concerne les tests écotoxicologiques, les groupes zoologiques concernés sont la macrofaune benthique, les larves d'huîtres, les poissons, tels que définis dans l'annexe 6 du rapport de la 15<sup>ème</sup> réunion du groupe conjoint de contrôle et de surveillance continus (GCCSC) qui s'est tenue à Lisbonne en 1990. Il existe des tests maîtrisés tels que :

- les anomalies de la fécondation et l'embryotoxicité, en général chez les échinodermes, les mollusques bivalves et les poissons .
- le bilan énergétique chez les moules et autres espèces.

Dans le cadre de la recherche de nouveaux tests écotoxicologiques, une mesure de l'activité estérase non-spécifique a été mise au point comme indicateur de l'activité métabolique cellulaire chez les microalgues (Minier *et al*, 1993), puis appliquée in situ pour un dosage sur des macroalgues (Cachot *et al*, 1994) . Les premiers résultats obtenus sur les macroalgues en Méditerranée semblent indiquer une augmentation de l'activité estérase en liaison avec le taux de pollution des sites de prélèvement. Ces résultats restent à confirmer.

Pour le volet biochimie, deux paramètres ont été retenus : l'acétylcholine estérase (AChE) et l'activité enzymatique ethoxyrésorufine o-dééthylase (EROD) (Galgani, 1987).

L'AChE est une enzyme impliquée dans la transmission de l'influx nerveux. Elle est inhibée par des polluants de type organophosphorés ou carbamates utilisés en agriculture. La mesure cette activité sensible à de faibles concentrations en produits phytosanitaires permet de percevoir un effet des produits toxiques dont la détection dans le milieu est difficile à mettre en oeuvre et dont la persistance en mer est controversée. L'application de ce dosage a été réalisée sur différentes espèces de poissons : la limande *Limanda limanda* en Mer du Nord, le callionyme *Callionymus lyra* en baie de Vilaine, le mullet *Mullus barbatus*, le surmulet *Mullus surmuletus*, le serran chèvre *Serranus cabrilla* et le serran hepatus *Serranus hepatus* en Méditerranée, le poisson chirurgien *Acanthurus bahianus* en Martinique (Bocquéne, 1996). Parallèlement des mesures d'activité AChE sont menées en laboratoire sur des invertébrés (la palourde et l'huître) soumis à divers polluants.

L'activité EROD est développée par les monooxygénases à cytochrome P450, enzymes qui ont dans les organismes un rôle de détoxification par métabolisation des xénobiotiques et qui sont localisées majoritairement dans le foie. Chez les poissons, la forme P450 IA1 est responsable de l'activité EROD et cette activité varie spécifiquement en présence de certains polluants organiques tels que les HAP, les PCB plans et les dioxines. Quatre espèces sentinelles ont été sélectionnées pour la surveillance des côtes Atlantiques et de la Méditerranée : la limande *Limanda limanda*, espèce benthique pour la Mer du Nord; le callionyme *Callionymus lyra*, espèce benthique pour la baie de Seine; le rouget de vase *Mullus barbatus* et le serran *Serranus hepatus*, espèces de fond pour la Méditerranée. La mesure de l'activité EROD a été réalisée sur la fraction S9 des foies de poisson (Burgeot, 1994, 1995).

Les études des mécanismes d'induction des cytochromes P450 par les xénobiotiques chez la moule (Michel, 1993) constituent une voie de recherche en cours de développement pour la mise au point de dosages immunochimiques simples sur une nouvelle espèce sentinelle.

A partir de 1992, deux sites pilotes ont été créés pour la mesure en routine de l'activité EROD. Il s'agit des laboratoires IFREMER de Port-en-Bessin sur la baie de Seine et de Toulon sur la Méditerranée. Ces laboratoires effectuent chacun 2 campagnes par an dans leur zone respective. Chaque campagne donne lieu au prélèvement et à l'analyse d'environ 200 échantillons de poissons. Jusqu'en 1992, les analyses étaient effectuées au laboratoire Ecotoxicologie de l'IFREMER à Nantes. En 1993 le laboratoire de Toulon a été équipé de façon à pouvoir mener cette surveillance de façon autonome. L'année 1994 a vu l'équipement de celui de Port-en-Bessin. En 1994, 900 analyses ont été réalisées dans le cadre de ce programme (4 répliquats sur 225 poissons). En avril 1995, une campagne spécifique de mesure de l'activité EROD s'est déroulée sur tout le bassin nord-occidental de la Méditerranée, incluant les côtes françaises, une partie des côtes espagnoles et italiennes, les Baléares, la Sicile, la Sardaigne et la Corse. Cette campagne a permis l'analyse de plus de 300 échantillons de poissons.

L'activité EROD figure parmi les premiers biomarqueurs retenus officiellement par la communauté scientifique du CIEM (Conseil International pour l'Exploration de la Mer) pour la surveillance de la Mer du Nord.

Le laboratoire Ecotoxicologie (DEL/Nantes) de l'IFREMER mène parallèlement des recherches en vue de l'obtention de nouveaux biomarqueurs de nature biochimique ou génétique pour l'évaluation de la toxicité des polluants chimiques sur les organismes marins notamment :

- les adduits à l'ADN\* et la recherche de micronuclei (aberrations chromosomiques);
- la recherche de protéines de résistance aux xénobiotiques (MXR Multi Xenobiotique Resistance);
- la recherche de mutations sur l'ADN.

La détection des adduits HAP à l'ADN a été effectuée en 1994 en Méditerranée sur des foies de rouget barbet *Mullus barbatus* selon deux méthodes de dosage complémentaires : par immunochimie (ELISA) et par post-marquage de l'ADN au P<sup>32</sup> (Burgeot, 1994). Des adduits de type HAP diol-époxyde supérieurs à 10/10<sup>8</sup> nucléotides ont été mesurés sur certains sites. La concordance des résultats obtenus par les deux méthodes n'est observable que sur les sites où la présence d'adduits est importante, ce qui est en accord avec les observations de Chipman *et al* (1992). Des essais supplémentaires sont nécessaires pour évaluer l'intérêt de la détermination des adduits en surveillance.

Le test micronuclei a été développé sur des hémocytes d'huitres *Crassostrea gigas* in vitro et in vivo en 1993 (Burgeot, 1994) et sur des hémocytes de moule *Mytilus galloprovincialis* in vivo en 1994 (Woll, 1994) pour évaluer l'effet génotoxique du milieu marin. Concernant *Crassostrea gigas*, les effets toxiques du benzo[a]pyrène, du sulfate de cuivre et d'un effluent de pâte à papier ont été mis en évidence in vitro. In vivo la fréquence des micronoyaux a été déterminée sur 200 Km de côtes entre l'estuaire de la Loire et celui de la Gironde. Le test in situ a fait apparaître un manque de sensibilité sur un site pollué par le cadmium et une grande variabilité inter-individus. Concernant *Mytilus galloprovincialis*, les résultats obtenus en Méditerranée montrent que le test est suffisamment sensible pour détecter une pollution ponctuelle mais qu'il ne permet pas de comparer les sites entre eux.

Parallèlement, le test micronuclei a été réalisé sur le sang de rouget barbet *Mullus barbatus* sur le site de Fos-sur-mer en Méditerranée et de callionyme *Callionymus lyra* dans la baie de Seine en 1994. Le test a montré une variabilité importante de la fréquence des micronuclei pour des individus d'une même station et aucune relation avec la concentration de polluants organiques dans le sédiment.

Face à ce manque de discrimination, les investigations concernant l'utilisation de ce test en surveillance ont été stoppées. L'application du test micronuclei in vitro sur des cellules de

---

\* La détermination des adduits à l'ADN chez les poissons a été recommandée par le CIEM en 1994 comme bioindicateur applicable dans le cas de pollution identifiée sur sites exposés aux polluants.



coeur d'huîtres en culture et le test sur les embryons d'huîtres semble plus encourageante pour évaluer l'effet génotoxique des effluents marins.

Des protéines MXR ont été mises en évidence par immunochimie chez l'huître *Crassostrea gigas* et chez la moule *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis* collectées, dans un premier temps, dans l'estuaire de la Gironde, dans le bassin de Marennes–Oléron et en baie de Seine respectivement ; puis, dans un deuxième temps, sur tout le littoral français (Minier *et al*, 1993). Parallèlement, un mécanisme de type MXR a été mis en évidence dans les ouïes de moule *Mytilus galloprovincialis* issue de la baie de Monterey en Californie (Galgani *et al*, 1996).

Les quantités de protéines MXR détectées chez la moule sont globalement fortes et varient en fonction du site de prélèvement, alors que chez l'huître ces quantités sont faibles. Bien qu'imparfaite une corrélation semble exister entre le taux de protéines MXR chez la moule et le niveau de contamination chimique observé sur les sites. Aucune corrélation n'a été obtenue avec les huîtres. L'étude a été poursuivie au niveau moléculaire avec pour enjeu de mettre en évidence par la technique PCR (Polymerase Chain Reaction) la présence du génotype MXR et d'obtenir une sonde nucléique permettant le dosage d'ARN messagers par slot–blot, cependant aucune portion génique appartenant à un probable gène MXR de mollusque n'a été amplifié (Minier, 1994). De plus l'utilisation de la sonde humaine MDR 1 5A n'a pas permis de trouver d'ARN messagers de moule correspondants (Galgani & Bénard, communication personnelle).

En ce qui concerne l'étude de la mutagenèse, les exons 1 et 2 du gène ras du mullet barbet *Mullus barbatus*, de la plie *Platichthys flesus* et du callionyme *Callionymus lyra* ont été amplifiés par RT–PCR, puis clonés et séquencés à partir de foie en vue de détecter des mutations liées à la présence de polluants. Une très forte homologie de séquence (80 à 86 %) a été observée avec les gènes ras humains (Vincent *et al*, 1995, 1996). Une mutation du codon 11, correspondant à la substitution d'une alanine par une thréonine, a été mise en évidence dans le foie hyperplasique de callionymes collectés dans l'estuaire de la Seine, zone particulièrement polluée par les PCB et les HAP. Le travail doit se poursuivre par le développement d'un modèle expérimental d'étude de la cancérogénèse permettant d'obtenir plus aisément des poissons porteurs de tumeurs du foie.

D'autre part, la caractérisation du gène p53 suppresseur de tumeur a été entreprise chez le flet (*Platichthys flesus*) et le callionyme (*Callionymus lyra*) (Cachot, 1995, 1994–95). Des fragments correspondant partiellement aux exons 7 et 8 ont été amplifiés par RT–PCR. La construction d'une banque d'ADNc a été réalisée chez le flet puis criblée avec la sonde flet obtenue par RT–PCR (fragment 130 pb). Deux clones positifs ont été obtenus et le clone présentant l'insert le plus long a été séquencé. Cet insert correspond à la totalité de la séquence codante du gène p53 de flet dont la séquence protéique a pu être déduite (Cachot, 1996). La mise au point de l'amplification sur l'ADN génomique de flet est en cours. Le travail sera

poursuivi par la recherche de mutations du gène p53 de foie chez des flets soumis à un protocole de cancérogénèse expérimentale, et chez des flets porteurs de tumeurs prélevés in situ en baie de Seine.

## CONCLUSION

Jusqu'au début des années 90 l'évaluation de la qualité d'un milieu se faisait uniquement par l'observation de paramètres en amont des effets toxiques d'une molécule sur la cible biologique finale (analyse chimique, tests d'écotoxicité). Cette méthodologie est insuffisante pour évaluer la santé d'un milieu complexe, multiparamétrique, avec des pollutions mixtes sujettes à des phénomènes de synergie ou d'antagonisme. La recherche de symptômes, c'est à dire des effets biologiques en aval de l'impact de la molécule toxique sur la cible biologique, permet d'évaluer globalement la santé d'un milieu, d'établir un diagnostic précis, de rechercher les causes des pathologies et d'entreprendre éventuellement une action curative. Le concept de biosurveillance (ou biomonitoring), qui repose sur l'étude de la réponse biologique des organismes aux polluants est en plein essor. Les réunions et les ateliers de travail d'experts internationaux du CIO (Commission Océanographique Internationale), du PNUE (Programme des Nations-Unies pour l'Environnement), du GEEP (Group of Experts on the Effects of Pollutants) et de la FAO (Workshops on the biological effects of pollutants on marine organisms) ont d'ores et déjà souligné l'urgence des solutions aux problèmes de pollutions et le besoin de recherches en toxicologie de l'environnement marin.

Les marqueurs biologiques chez les animaux et les plantes jouent le rôle de sentinelles et constituent une nouvelle approche pour l'évaluation des effets d'une contamination de l'environnement sur les écosystèmes.

Concernant le choix du biomarqueur celui-ci doit pouvoir idéalement lier la toxicité d'un produit chimique à un (des) effet(s) biologique(s).

Parmi les marqueurs biochimiques ou physiologiques non-spécifiques d'un polluant mais indicateurs d'une toxicité cellulaire générale, le bilan énergétique (Scope for growth) et les marqueurs de stress oxydatif tels que le calcium intracellulaire ou les indices de lipoperoxydation ont reçu une attention particulière (Lafaurie *et al*, 1992). Chez la moule les résultats obtenus semblent indiquer qu'il existe une corrélation entre le calcium intracellulaire et les teneurs du milieu en polluants organiques de type HAP et PCB alors que chez les poissons cette corrélation semble plutôt s'établir avec les métaux (Cu, Zn, Cd)(Gnassia-Barelli *et al*, 1990; Narbonne *et al*, 1991). Suivant l'espèce, la peroxydation des lipides apparaît sensible soit aux deux types de polluants soit à un seul mais peut être également fortement influencée par des facteurs physiologiques intrinsèques.

La réponse du système immunitaire aux polluants semble être une voie prometteuse. Weeks *et al* (1990) ont montré des variations d'activité des macrophages (chimiotactisme, phagocytose, accumulation de mélanine) en fonction de la contamination de l'environnement. La biosurveillance immunologique est actuellement limitée par l'absence d'une méthodologie bien établie appliquée aux mesures in situ; elle représente donc une voie de recherche à explorer.

Parmi les marqueurs biochimiques spécifiques, l'EROD et l'AChE ont été adoptés en biosurveillance pour la qualité de la réponse qu'ils donnent aux polluants organiques de type HAP et PCB, et composés organophosphorés et carbamates respectivement. La spécificité des métallothionéines et de la  $\Delta$ -ALAD reste, par contre, à démontrer.

Concernant les marqueurs de génotoxicité, le test micronuclei s'est avéré peu discriminant et pratiquement difficilement adaptable à une mise en application en biosurveillance, tandis que la mise en évidence d'adduits à l'ADN reste à valider. La recherche, plus amont, de mutations sur l'ADN en liaison avec les polluants donne des résultats encourageants avec l'oncogène ras, mais le problème de la mise en pratique de la détermination de ce type de mutations in situ par des techniques encore sophistiquées et coûteuses reste posé.

En plus des orientations prises ci-dessus, et en tenant compte des résultats obtenus sur la protéine MXR chez les mollusques, il semblerait intéressant de regarder de plus près le problème de l'adaptation des organismes marins aux milieux pollués (écotolérance) en étudiant au niveau génique les processus d'acquisition de caractères de résistance : acquisition de gènes de résistance et amplification de gènes notamment.

## BIBLIOGRAPHIE

- AARONSON S.A., 1991. Growth factors and cancer. *Science*, 254, 1146–1153.
- ABARNOU A., 1993. Contamination des poissons plats de la baie de Seine par les PCBs. Rapport IFREMER–AESN.
- ADAM D., WITTBRODT J., TELLING A. AND SCHARTL M., 1988. RFLP for an EGF-receptor related gene associated with the melanoma oncogene locus of *Xiphophorus maculatus*. *Nucl. Acids Res.*, 16, 7212.
- ADAMSON R.H., 1967. Drug metabolism in marine vertebrates. *Fed. Proc.*, 26, 1047.
- AGENCES DE L'EAU, 1996. *Génotoxicité : un choix entre le test pleurodèle (Jaylet) et le test xénope*, Etude inter agences n°44, Agences de l'eau/Ministère de l'environnement.
- AHNSTROM G. AND ERIXON K., 1980. Measurement of strand breaks by alkaline denaturation and hydroxyapatite chromatography, in *DNA Repair*, vol. 1, Part A., E.C. Friedbert and P.C. Hanawalt, Eds, New–York, Marcel Dekker, Inc., pp. 403–419
- ANDERS F., 1967. Tumor formation in platyfish–swordtail hybrids as a problem of gene regulation. *Experientia*, 23, 1.
- ANDERS F., SCHARTL M., BARNEKOW A. AND ANDERS A, 1984.. *Xiphophorus* as an in vivo model for studies on normal and defective control of oncogenes. *Adv. Cancer Res.*, 42, 191.
- ANDERS F., SCHARTL M., BARNEKOW A., SCHMIDT C.R., LÜKE, JAENEL–DESS G.W. AND ANDERS A., 1985. The genes that carcinogens act upon, in *Haematology and Blood Transfusion*, vol. 29 : *Modern Trends in human Leukemia VI*, R. Neth, C.R. Gallo, M.F. Greaves and Janka, Eds, Springer–Verlag, Berlin, p. 228.
- ANDERSSON T. & FORLIN L., 1992. Regulation of the cytochrome P450 enzyme system in fish. *Aquat. Toxicol.*, 24, 1.
- ANDERSSON T., 1992. Purification, characterization and regulation of a male–specific cytochrome P450 in the rainbow trout kidney. *Mar. Environ. Res.*, 34, 109.
- ASCIONE R., SACCHI N., WATSON D.K., FISHER R.J., FUJIWARA S., SETH A. AND PAPAS T.S., 1986. Oncogenes : molecular probes for clinical application in malignant diseases. *Gene Anal. Tech.*, 3, 25.
- ASHLEY L.M., HALVER J.E. & WOGAN G.N., 1964. Hepatoma and aflatoxicosis in trout. *Fed. Proc.*, 23, 105.
- BAER K.N. & BENSON W., 1987. Influence of chemical and environmental stressors on acute cadmium toxicity. *J. Toxicol. Environ. Health*, 22, 35–44.
- BAIRD W.M., 1979. The use of radioactive carcinogens to detect DNA modifications, in *Chemical Carcinogens and DNA* (P.L. Grover, Ed.), CRC Press, Boca Raton, p. 59.

- BALMAIN A. AND BROWN K., 1988. *Adv. Cancer Res.*, 51, 147-182.
- BARBACID M., 1987. Ras genes. *Ann. Rev. Biochem.*, 56, 779-827.
- BARNEKOW A., SCHARTL M., ANDERS F. AND BAUER H., 1982. Identification of a fish protein associated with a kinase activity and related to the Rous sarcoma virus transforming protein. *Cancer Res.*, 42, 2429.
- BAUMANN P.C., SMITH W.D. & PARLAND P.K., 1987. Tumor frequencies and contaminant concentrations in brown bullheads from an industrialized river and a recreational lake. *Trans. Am. Fish. Soc.* 116, 79.
- BAUMANN P.C., HARSHBARGER J.C. & HARTMAN K.J., 1990. Relationship between liver tumors and age in brown bullhead populations from two Lake Erie tributaries. *Sci. Total Environ.*, 94, 71.
- BAUMANN P.C., MAC M.J., SMITH S.B. & HARSHBARGER J.C., 1991. Tumor frequencies in walleye (*Stizostedion vitreum*) and brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*) and sediment contaminants in tributaries of the Laurentian Great Lakes, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48, 1804.
- BECKER D.S., GINN T.C., LANDOLT M.L. & POWELL D.B., 1987. Hepatic lesions in English sole (*Parophrys vetulus*) from Commencement Bay, Washington (USA). *Mar. Environ. Res.*, 23, 153.
- BEND J.R., JAMES M.O. & DANSETTE P.M., 1977. In vitro metabolism of xenobiotics in some marine animals. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 298, 505.
- BEND J.R. & JAMES M.O., 1978. Xenobiotic metabolism in marine and freshwater species, in *Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology.*, D.C. Malins and J.R. Sargent, Eds., New York : Academic Press, pp. 128-172.
- BERNARDS R., SCHACKLEFORD G.M., GERBER M.R., HOROWITS J.M., FRIEND S.H., SCHARTL M., BOGERMANN E., RAPORT J.M., MCGEE T., DRYJA T.P. AND WEINBERG R.A., 1989. Structure and expression of the murine retinoblastoma gene and characterization of its encoded protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86, 6474.
- BINDER R.L. & LECH J.J., 1984. Xenobiotics in gametes of Lake Michigan lake trout (*Salvelinus namayucush*) induce hepatic monooxygenase activity in their offspring. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 4, 1042.
- BLACK J.J., 1988. Fish tumors as known field effects of contaminants. Chronic Effects of Toxic Contaminants on Large Lakes, Schmidtke, N.W., Ed., *Toxic Contam. Large Lakes*, 1, 55.
- BLACK J.J. & BAUMANN P.C., 1991. Carcinogens and cancers in freshwater fishes. *Environ. Health Perspect.*, 90, 27.

- BOCQUENE G., 1996. L'acetylcholinestérase, marqueur de neurotoxicité. Application à la surveillance des effets biologiques des polluants chez les organismes marins. Thèse, Ecole Pratique des Hautes Etudes, Montpellier.
- BOEHM T.L. AND DRAHOVSKY D., 1983. Alteration of enzymatic methylation of DNA cytosines by chemical carcinogens : a mechanism involved in the initiation of carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 71, 429–433.
- BOS J.L., 1988. The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutat. Res.*, 195, 255–271.
- BOURGOIN J. & ALZIEU C., 1990. L'environnement littoral en l'an 2000? Quels enjeux pour la recherche? *Rapport DERO–D/90.097*, IFREMER.
- BRUGGEMAN W.A., OPPERHUIZEN A., WIJBENGA A. & HUTZINGER O., 1984. Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish. *Toxicol. Environ. Chem.*, 7, 173.
- BURCHELL B., NEBERT D.W., NELSON D.R., BOCK K.W., IYAGANI T., JANSEN P.L.M., LANCET D., MULDER G.J., ROY-CHOWDHURY J., SIEST G., TEPHLY T.R. & MACKENZIE P.I., 1991. The UDP-glucuronosyltransferase gene superfamily : suggested nomenclature based on evolutionary divergence. *DNA Cell Biol.*, 10, 487.
- BURGEOT T., 1994. L'ethoxyresorufine-o-deethylase, les adduits à l'ADN et les micronuclei dans les organismes marins. Application à la surveillance des effets biologiques sur les côtes françaises. Thèse, Université de Nantes.
- BURGEOT T., 1995. Biosurveillance du milieu marin. DEL/EX, IFREMER.
- BURNS K.A., 1976. Microsomal mixed function oxidases in a estuarine fish, *Fundulus heteroclitus*, and their introduction as a result in environmental contamination. *Comp. Biochem. Physiol.*, 53, 443–446.
- CACHOT J., ROMANA L.A. & GALGANI F., 1994. In vivo esterase activity in protoplasts as a bioassay of environmental quality. *Aquatic Botany*, 48, 297–312.
- CACHOT J., 1994–95. Séquences partielles du gène p53 chez le flet et le dragonnet. Rapport de DEA, Université de Rennes I / IFREMER DEL/EX.
- CACHOT J., 1995. P53 et cancer. Rapport Creocéan, IFREMER DEL/EX.
- CACHOT J., 1996. Etude de la mutagénèse chez les poissons marins. Rapport d'activité 1996, IFREMER DEL/EX.
- CAQUET T., THYBAUD E., LE BRAS S., 1989. Utilisation de mésocosmes pour l'étude du comportement et des effets biologiques des composés phytosanitaires en milieu aquatique. Application à la Deltaméthrine. *Med. Fac. Landbouw. Rijkuniv. Gent.*, 54, n° 36, 1049–1060.
- CASTREN M. & OIKARI A., 1983. Optimal assay conditions for liver UDP-glucuronosyltransferase from the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 76C, 365.

- CEDAR H. 1988. DNA methylation and gene activity. *Cell*, 53, 3-4.
- CHAMBERS J.E. & YARBOROUGH J.D., 1976. Xenobiotic biotransformation systems in fishes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 55 C, 77.
- CHANG Y., MATHEWS C., MANGOLD K., MARIEN K., HENDRICKS J. AND BAILEY G., 1991. Analysis of ras gene mutations in rainbow trout liver tumors initiated by aflatoxin B1. *Mol. Carcinogen.*, 4, 112.
- CHIPMAN J.K., MARSH J.W., LIVINGSTONE D.R. & EVANS B., 1992. Genetic toxicity in dab, *Limanda limanda* from the North sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 91, 121-126.
- CLARKE D.J., GEORGE S.G. & BURCHELL B., 1991. Glucuronidation in fish. *Aquat. Toxicol.*, 20, 35.
- CLARKE D.J., BURCHELL B. & GEORGE S.G., 1992. Differential expression and induction of UDP-glucuronosyltransferase isoforms in hepatic and extrahepatic tissues of a fish, *Pleuronectes platessa* : immunochemical and functional characterization. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 115, 130.
- COLE M.D., 1986. The myc oncogene : its role in transformation and differentiation. *Annu. Rev. Genet.*, 20, 361.
- COMMITTEE ON BIOLOGICAL MARKERS OF THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1987. Biological Markers in Environmental Health Research, in *The Role of Biomarkers in Reproductive and Developmental Toxicology*, *Environ. Health Pers.*, 74, 3-9.
- COMOGLIO P.M., DIRENZO M.F., GAUDINO G., PONZETTO C. AND PRAT M., 1990. Tyrosine kinase and control of cell proliferation. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 142, S16.
- COOPER G.M., 1990. *Oncogenes*, Jones and Bartlett, Boston.
- COOPER G.M., 1992. Oncogenes as markers for early detection of cancer. *J. Cell. Biochem.*, 50 (suppl. 16G), 131.
- COPPAGE D.L., MATTHEWS E., COOK G.H. & KNIGHT J., 1975. Brain acetylcholinesterase inhibition in fish as a diagnosis of environmental poisoning by malathion, O-O-dimethyl S-(1,2-dicarbethoxyethyl)phosphorodithioure. *Pest. Biochem. Physiol.*, 5, 536-542.
- CORBEL M.J., 1975. The immune response in fish : a review. *J. Fish Biol.*, 7, 539-563.
- CORMIER S.M., 1986. Fine structure of hepatocytes carcinoma of the atlantic tomcod, *Microgadus tomcod* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, 9, 179-194.
- CORMIER S.M., RACINE R.N., SMITH C.E., DEY W.P. & PECK T.H., 1989. Hepatocellular carcinoma and fatty infiltration in the Atlantic tomcod. *Microgadus tomcod* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, 12, 105.
- COSSA D., MEYBECK M., IDLAFKIH Z. & BOMBLED B., 1994. Etude pilote des apports en contaminants par la Seine. Rapport interne DEL/94.13/Nantes, IFREMER.



- CUSHING J.E., 1970. Immunology of fish, in *Fish physiology*, W.S. Hoar & D.J. Randall, Eds, Academic Press.
- DALICH G.M. & LARSON R.E., 1985. A comparative study of the hepatotoxicity of monochlorobenzene in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and the sprague-dawley rat. *Comp. Biochem. Physiol.*, 80 C, 115-122.
- DANIEL F.B., HAAS D.L. AND PYLE S.M., 1985. Quantitation of chemically induced DNA Strand breaks in human cells via an alkaline unwinding assay. *Anal. Biochem.*, 144, 390-402.
- DAWE C.J., STANTON M.F. & SCHWARTZ F.J., 1964. Hepatic neoplasms in native bottom-feeding fish of Deep Creek Lake, Maryland. *Cancer Res.*, 24, 1194.
- DE SERRES F.J., 1988. Banburry Center DNA Adducts Workshop, meeting report. *Mutat. Res.*, 203, 55.
- DEAN J.H., LUSTER M.I., MUNSON A.E. & AMOS H. *Immunotoxicology and Immunopharmacology*, New York, Raven Press.
- DEN OTTER *et al.*, 1990. Oncogene mutations in anti-oncogenes : a view. *Anticancer Res.*, 10, 475.
- DESTREE O.H.J., LAM K.T., PETERSON-MADURO L.J., EIZEMA K., DILLER L., GRYKA M.A., FREBOURG T., SHIBUYA E. AND FRIEND S.H., 1992. Structure and expression of the xenopus retinoblastoma gene. *Dev. Biol.*, 153, 141.
- DIXON D.G. & SPRAGUE J.B., 1981. Copper bioaccumulation and hepatoprotein synthesis during acclimation to copper by juvenile rainbow trout. *Aquat. Toxicol.*, 1, 69-81.
- DOWNWARD J., YARDEN Y., MAYES E., SCRACE G., TOTTY N., STOCKWELL P., ULLRICH A., SCHLESSINGER J. AND WATERFIELD M.D., 1984. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature*, 307, 521.
- DOWNWARD J., 1990. The ras superfamily of small GTP-binding proteins. *TIBS*, 15, 469.
- DROY B.F., DAVIS M.E. & HINTON D.E., 1989. Mechanism of allyl formate-induced hepatotoxicity in rainbow trout. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 98, 313-324.
- DUNN B., BLACK J. AND MACCUBBIN A., 1987. 32P-postlabeling analysis of aromatic DNA adducts in fish from polluted areas. *Cancer Res.*, 47, 6543-6548.
- DUNN B.P., 1990. DNA-carcinogen adducts in fish as a tool for measuring the biological dose of aquatic carcinogens, in *In Situ Evaluation of Biological Hazards*, S.S. Sandhu, Ed., Plenum Press, New-York, p. 177
- DUNN B.P., 1991. Carcinogen adducts as an indicator for the public health risks of consuming carcinogen-exposed fish and shellfish. *Environ. Health Perspect.*, 90, 111.
- EHRlich M. AND YANG R.Y.-H., 1981. 5-methylcytosine in eukaryotic DNA. *Science*, 212, 1350-1357.

- EGGENS M.L., 1995. *Cytochrome P450 1A induction in North sea flatfish as biomarker of exposure to dioxin-type compounds*, Universiteit Utrecht, Faculteit Dier geneeskunde, Nederlands.
- ESTABROOK R.W., COOPER D.Y. & ROSENTHAL O., 1963. The light-reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C-21 hydroxylase of the adrenal cortex. *Biochem. J.*, 338, 741.
- FALANY C.N., 1991. Molecular enzymology of human liver cytosolic sulfotransferases. *Trends Pharmacol. Sci.*, 12, 255.
- FALKMER S., EMDIN S.O., OSTBERG Y., MATTISSON Y.A., JOHANSSON SJOBECK M.L. & FANGE R., 1976. Tumor pathology of the hagfish, *Myxine glutinosa*, and the river lamprey, *Lampetra fluviatilis*. *Progr. Exp. Tumor Res.*, 20, 217.
- FALKMER S., MARKLUND S., MATTISSON P.E. & RAPPE C., 1977. Hepatomas and other neoplasms in the Atlantic hagfish (*Myxine glutinosa*) : a histopathologic and chemical study. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 298, 342.
- FONG A.T., HENDRICKS J.D., DASHWOOD R.H., VAN WINKLE S. AND BAILEY G.S., 1988. Formation and persistence of ethylguanine in liver DNA of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) treated with diethylnitrosamine by water exposure. *Food Chem. Toxicol.*, 26, 699.
- FOUREMAN G.L., HERNANDEZ O., BHATIA A. & BEND J.R., 1987. The stereoselectivity of four hepatic glutathione S-transferases purified from a marine elasmobranch (*Raja erinacea*) with several K-region polycyclic arene oxide substrates. *Biochim. Biophys. Acta*, 914, 127.
- FRITH C.H. & WARD J.L., 1980. A morphologic classification of proliferative and neoplastic hepatic lesions in mice. *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 3, 329.
- GALGANI F., 1987. Evaluation des méthodes biochimiques applicables à la surveillance biologique de l'environnement marin. Rapport DERO-87-17-MR, IFREMER.
- GALGANI F., CORNWALL R., HOLLAND TOOMEY B. and EPEL D., 1996. Interaction of environmental xenobiotics with multixenobiotic defense mechanism in the bay mussel *Mytilus galloprovincialis* from the coast of California. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15, 3, 325-331.
- GARDNER G.R. & PRUELL R.J., 1988. Histopathological and chemical assessment of winter flounder, lobster and soft-shelled clam indigenous to Quincy Bay, Boston Harbor and an in situ evaluation of oysters including sediment (surface and cores) chemistry. *U.S. Environmental Protection Agency, Region 1, Boston MA.*
- GARDNER G.R., PRUELL R.J. & FOLMAR L.C., 1989. A comparison of both neoplastic and non-neoplastic disorders in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) from eight areas in New England. *Mar. Environ. Res.*, 28, 393.

- GEORGE S.G. & BUCHANAN G., 1990. Isolation, properties and induction of plaice liver cytosolic glutathione S-transferases. *Fish Physiol. Biochem.*, 8, 437.
- GINGERICH W.H., 1982. Hepatic toxicology of fishes. In *Aquatic Toxicology*, L. Weber, Ed., New-York, Raven Press, p. 55-105.
- GNASSIA-BARELLI N., ROMEO M., MATHIEU A., RIBERA D., GARRIGUES P. & LAFAURIE M., 1990. Evaluation du contenu en calcium intracellulaire et en métaux traces d'un organe (la branchie) chez le poisson et la moule. *Rapp. Comm. Int. Mer Médit.*, 32, 287.
- GOEGER D.E., SHELTON D.W., HENDRICKS J.D., PEREIRA C. & BAILEY G.S., 1988. Comparative effect of dietary butylated hydroxyanisole and  $\beta$ -naphthoflavone on aflatoxin B1 metabolism, DNA adduct formation, and carcinogenesis in rainbow trout. *Carcinogenesis*, 9, 1793.
- GOKSOYR A. & FORLIN L., 1992. The cytochrome P450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquat. Toxicol.*, 22, 287.
- GOLDBERG Y.P., PARKER M.I. AND GEVERS W., 1990. The genetic basis of cancer. *SAMJ*, 80, 99.
- GONZALEZ F.J., 1989. The molecular biology of cytochrome P-450s. *Pharmacol. Rev.*, 40, 243.
- GRUE C.E., FLEMMING W.J., BUSBY D.G. & HILL E.F., 1983. Assessing hazards of organophosphate pesticides to wildlife. *Trans. N. Am. Wildl. Nat. Resour. Conf.*, 48, 200-220.
- GUENGERICH F.P. & MACDONALD T.L., 1990. Mechanisms of cytochrome P450 catalysis. *FASEB J.*, 4, 2453.
- GUPTA R.C. AND RANDEKATH K., 1988. Analysis of DNA adducts by  $^{32}\text{P}$ -labeling and thin layer chromatography, in *DNA Repair*, vol.3, E. Friedberg and P.H. Hanawalt, Eds, New-York, Marcel Dekker, Inc., pp. 399-418.
- HAASCH M.L., WEJKSNORA P.J., STEGEMAN J.J. & LECH J.J., 1989. Cloned Rainbow Trout liver P1450 complementary DNA as a potential environmental monitor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 98, 362-368.
- HAASCH M.L., PRINCE R., WEJKSNORA P.J., COOPER K.R. & LECH J.J., 1993. Caged and wild fish : induction of hepatic cytochrome P-450 (CYP1A1) as an environmental monitor. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12, 885.
- HAHN M.E., POLAND A., GLOVER E. & STEGEMAN J.J., 1991. The Ah receptor in marine animals : phylogenetic distribution and relationship to cytochrome P4501A inducibility. *Mar. Environ. Res.*
- HALLIWELL B. & GUTTERIDGE J.M.C., 1985. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford, Clarendon Press

- HALVER J.E., 1967. Crystalline aflatoxin and other vectors for trout hepatoma, in *Trout Hepatoma Research Papers*, Research Report # 70 Washington, U.S. Fish and Wildlife Service, Washington D.C., 78.
- HAMILTON S.J. & MEHRLE P.M., 1986. Metallothionein in fish : review of its importance in assessing stress from metal contaminants. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 115, 596–609.
- HAMMOND P.B. & BELILE R.P., 1980. Metals, in *Cassarett and Doull's Toxicology : The Basic Science of Poisons*, J. Doull, C.D. Klassen and M.O. Amdur, Eds, New York : MacMillan, pp 409–467.
- HANNIG G., OTTILIE S. AND SCHARTL M., 1991. Conservation of structure and expression of the c-yes and fyn genes in lower vertebrates. *Oncogenes*, 6, 361.
- HARRIS C.C., 1985. Future directions in the use of DNA adducts as internal dosimeters for monitoring human exposure to environmental carcinogens. *Environ. Health Perspect.*, 62, 185.
- HARRIS C.C., 1991. Chemical and physical carcinogenesis : advances and perspectives for the 1990's. *Cancer Res.*, 51 (suppl.), 5023s.
- HARSHBARGER J.C. & CLARK J.B., 1990. Epizootiology of neoplasms in bony fish of North America. *Sci. Total Environ.*, 94, 1.
- HAUX C., LARSSON A., LITHNER G. & SJOBECK M.L., 1986. A field study of physiological effects on fish in lead-contaminated lakes. *Environ. Toxicol. Chem.* 5, 283–288.
- HAYA K. & WAIWOOD B.A., 1983. Adenylate energy charge and ATPase activity : potential biochemical indicators of sublethal effects caused by pollutants in aquatic organisms, in *Aquatic Toxicology*, J.O. Nriagu. Ed., New York, John Wiley & Sons, Inc., pp. 307–333.
- HAYES M.A., SMITH I.R., RUSHMORE T.H., CRANE T.L., THORN C., KOCAL T.E. & FERGUSON H.W., 1990a. Pathogenesis of skin and liver neoplasms in white suckers from industrially polluted areas in Lake Ontario. *Sci. Total. Environ.*, 94, 105.
- HAYES J.D., PICKETT C.B. & MANTLE T.J., 1990b. *Glutathione S-Transferases and Drug Resistance*, Hayes, J.D., Mantle, T.J. & Pickett C.B., Eds. Taylor and Francis London.
- HELLAWELL J.M., 1986. Ecological indicators of freshwater pollution and environmental management, Elsevier. *Appl. Sci. Pub.*, Barking.
- HINTON D.E., COUCH J.A., TEH S.T. & COURTNEY L.A., 1988. Cytological changes during progression of neoplasia in selected fish species. *Aquat. Toxicol.*, 11, 77.

- HINTON D.E., 1994. Structural considerations in teleost hepatocarcinogenesis : gross and microscopic features including architecture, specific cell types and focal lesions. In *Atlas of Neoplasms and Related Disorders*, Dawe C.J., Ed., Academic Press, New York.
- HIS E., BEIRAS R., QUINIOU F., PARR A.C.S., SMITH M.J., COWLING M.J. & HODGKIESS T., 1995. The non-toxic effects of a novel antifouling material on oyster culture. *Water Research*.
- HODSON P.V., BLUNT B.R. & WHITTLE D.M., 1984. Monitoring lead exposure of fish, in *Contaminant effects on fisheries*, Cavins V.W., Hodson P.V. & Nriagu J.O., Eds., John Wiley & Sons.
- HOLLIDAY R., 1987. The inheritance of epigenetic defects. *Science*, 238, 163–170.
- HOLLSTEIN M., SIDRANSKY D., VOGELSTEIN B. AND HARRIS C.C., 1991. p53 mutations in human cancers. *Science*, 253, 49.
- HOOPER M.J., 1988. Avian Cholinesterases : Their Characterization and Use in Evaluating Organophosphate Insecticide Exposure, PhD Thesis, University of California, Davis, CA.
- HOSE J.E., CROSS J.N., SMITH S.C. AND DIEHL D., 1987. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites off southern California. *Mar. Environ. Res.*, 22, 167–176.
- IFEN, 1994–1995. L'environnement en France et catalogue des sources de données de l'environnement. Dunod, Paris.
- IOANNIDES C. & PARKE D.V., 1990. The cytochrome P450I gene family of microsomal hemoproteins and their role in the metabolic activation of chemicals. *Drug Metab. Rev.*, 22, 1.
- JAMES M.O., 1987. Conjugation of organic pollutants in aquatic species. *Environ. Health Perspect.*, 71, 97.
- JAMES M.O., 1989. Cytochrome P450 monooxygenase in crustaceans. *Xenobiotica*, 19, 1063–1076.
- JOANNY M., BELIN C., CLAISSE D., MIOSSEC L., BERTHOME J.P., GROUHEL A. et RAFFIN B., 1993. Qualité du milieu marin littoral. Editions IFREMER, 241 pages.
- JOHANSSON-SJOBECK M.L. & LARSSON A., 1979. Effects of inorganic lead on delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in the Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 8, 419–431.
- JOHNSON L.L., STEHR C.M., OLSON O.P., MYERS M.S., PIERCE S.M., WIGREN C.A., MCCAIN B.B. & VARANASI U., 1993. Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the north east coast of the United States. *Environ. Sci., Technol.*

- KAGI J.H.R. & NORDBERG M., 1979. *Metallothionein*, Basel, Switzerland : Birk-häuser-Verlag.
- KAGI J.H.R. & KOJIMA Y., 1987. *Metallothionein II*, Basel, Switzerland : Birk-häuser-Verlag.
- KAHN S.M., JIANG W. AND WEINSTEIN I.B., 1990. Rapid nonradioactive detection of ras oncogenes in human tumors. *Amplifications*, 4, 22-26.
- KANTER P.M. AND SCHWARTZ H.S., 1982. A fluorescence enhancement assay for cellular DNA damage. *Mol. Pharmacol.*, 22, 145-151.
- KAPLAN L.A.E., SCHULTZ M.E., SCHULTZ R.J. & CRIVELLO J.F., 1991. Nitrosodiethylamine metabolism in the viviparous fish *Poeciliopsis* : evidence for the existence of liver P450 activity and expression. *Carcinogenesis*, 12, 647.
- KAPPUS H., 1986. Overview of enzyme systems involved in bioreduction of drugs and in redox cycling. *Biochem. Pharmacol.*, 35, 1.
- KERKVLIEET N., 1986. Measurements of immunity and modifications by toxicants, in *Safety Evaluation of Drugs and Chemicals*, W.E. Lloyd, Ed., Washington, D.C., Hemisphere Publ. Corp., pp. 235-256.
- KHAN M.A.Q., FORTE F. & PAYNE J.F., 1976. Metabolism of pesticides by aquatic animals, in *Pesticides in Aquatic Environments*, Khan, M.A.Q., Ed., Plenum Press, New York, p.191.
- KITO H., TAZAWA T., OSE Y., SATO T. & ISHIKAWA T., 1982. Protection by metallothionein against cadmium toxicity. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73C, 135-139.
- KLEINOW K., MELANCON M.J. & LECH J.J., 1987. Biotransformation and induction : implications for toxicity, bioaccumulation and monitoring of environmental xenobiotics in fish. *Environ. Health Perspect.*, 71, 105-119.
- KLOEPPER-SAMS P.J., & STEGEMAN J.J., 1989. The temporal relationships between P450E protein content, catalytic activity, and mRNA levels in the teleost *Fundulus heteroclitus* Following Treatment with  $\beta$ -Naphthoflavone. *Arch. Biochem. Biophys.*, 268, 525-535.
- KOHLER L.D. & EXON J.H., 1985. The rat as a model for immunotoxicity assessment, in *Immunotoxicology and Immunopharmacology*, J.H. Dean, M.I. Luster, A.E. Munson and H. Amos, Eds, New York, Raven Press, pp. 99-112.
- KOTSONIS F.N. & KLAASSEN C.D., 1978. The relationship of metallothionein to the toxicity of cadmium after prolonged oral administration to rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 46, 39-54.
- KRANZ H. & DETHLEFSEN V., 1990. Liver anomalies in dab *Limanda limanda* from the southern North Sea with special consideration given to neoplastic lesions. *Dis. Aquat. Org.*, 9, 171.

- KRAYBILL H.F., DAWE C.J., HARSHBARGER J.C. & TARDIFF R.G., 1977. Aquatic pollutants and biologic effects with emphasis on neoplasia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 298, 604.
- KUKSIS A., 1984. Intestinal digestion and absorption of fat-soluble environmental agents, in *Intestinal Toxicology*, Schiller, C.M., Ed., Raven Press, New York, p. 69.
- LAFABRIE M., NARBONNE J.F. & GALGANI F., 1992. Indicateurs biochimiques de contamination de l'environnement marin. *Analisis*, 20, 6, 27-33.
- LANDERS J.P. & BUNCE J.J., 1991. The Ah receptor and the mechanism of dioxin toxicity, *Biochem. J.*, 276, 273.
- LANDOLT M.L., HOLMES E.H. & OSTRANDER G.K., 1985. Preneoplastic cellular changes associated with exposure to environmental contaminants in Puget Sound, Washington, *Mar. Environ. Res.*, 17, 334.
- LANGENBACH R., SMITH P.B. & CRESPI C., 1992. Recombinant DNA approaches for the development of metabolic systems used in in vitro toxicology. *Mutat. Res.*, 277, 251.
- LASSUS P., BOGE G., GENTIEN P., LOARER R., PAGANO G. & F. QUINIOU, 1990. Toxicité des rejets urbains. Colloque la mer et les rejets urbains, Bendor, 13-15 juin.
- LECH J.J., VODICNIK M.J. & ELCOMBE C.R., 1982. Induction of monooxygenase activity in fish, in *Aquatic Toxicology*, Raven Press, p. 107.
- LEE R.F., 1982. Mixed function oxygenase (MFO) in marine invertebrates, *Mar. Biol. Let.*, 2, 87-105.
- LIVINGSTONE D.R., 1989. Cytochrome P-450 and oxidative metabolism in molluscs. *Xenobiotica*, 19, 1041-1062.
- LIVINGSTONE D.R., KIRCHIN M.A. & WISEMAN A., 1989. Cytochrome P450 and oxidative metabolism in mollusks. *Xenobiotica*, 19, 1041.
- LIVINGSTONE D.R., GARCIA-MARTINEZ P., MICHEL X., NARBONNE J.F., O-HARA S., RIBERA D. & WINSTON G.W., 1990. Oxyradical generation as a pollution-mediated mechanism of toxicity. *Funct. Ecol.*, 4, 415.
- LIVINGSTONE D.R., 1991. Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates, in *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, R. Gilles, Ed., Berlin, Springer-Verlag, pp.45-185.
- LIVINGSTONE D.R., DONKIN P. & WALKER C.H., 1992. Pollutants in Marine Ecosystems : an overview, in *Persistent Pollutants in Marine Ecosystems*, a special publication of SETAC, Pergamon Press.
- LOCKHART W.L., WAGEMANN R., CLAYTON J.W., GRAHAM B. & MURRAY D., 1975. Chronic toxicity of a synthetic tri-aryl phosphate oil to fish. *Environ. Physiol. Biochem.*, 5, 361-369.

- LOEB L.A., 1991. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.*, 51, 3075.
- LOHMAN P.H.M., VIJG J., UITTERLINDEN A.G., SLAGBOOM P., GOSSEN J.A. AND BERENDS F., 1987. DNA methods for detecting and analyzing mutations *in vivo*. *Mutat. Res.*, 181, 227.
- LOIZEAU V., 1993. Modélisation de la bioaccumulation des PCBs dans un réseau trophique simple en baie de Seine (réseau trophique de la limande). Thèse océanographie, Université Aix-Marseille.
- LOWE-JINDE L. & NIIMI A.J., 1984. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 13, 759-764.
- LUSTER M.I., MUNSON A.E., THOMAS P.T., HOLSAPPLE M.P., FENTERS J.D., WHITE K.L., LAUER L.D., GERMOLEC D.R., ROSENTHAL G.J. & DEAN J.H., 1988. Development of a testing battery to assess chemical-induced immunotoxicity : National Toxicology Program's Guidelines for Immunotoxicity Evaluation in Mice. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 10, 2-19.
- LUTZ W.K., 1990. Dose-response relationship and low dose extrapolation in chemical carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 11, 1243.
- MAC MAHON G., HUBER L.J., MOORE M.J., STEGEMAN J.J. AND WOGAN G.N., 1990. Mutations in c-Ki-ras oncogenes in diseased livers of winter flounder from Boston Harbor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87, 841-845.
- MALINS D.C., McCAIN B.M., BROWN D.W., MYERS M.S., KRAHN M.M. & CHAN S.L., 1987. Toxic chemicals, including aromatic and chlorinated hydrocarbons and their derivatives, and liver lesions in white croaker (*Genyonemus lineatus*) from the vicinity of Los Angeles. *Environ. Sci. Technol.*, 21, 765.
- MANGOLD K., CHANG Y., MATHEWS C., MARIEN K., HENDRICKS J. AND BAILEY G., 1991. Expression of ras genes in rainbow trout liver. *Mol. Carcinogen.*, 4, 97.
- MANNERVIK B. & DANIELSON U.H., 1988. Glutathione transferases - structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 23, 283.
- MARCHAND M., ABARNOU A. & MARCAILLOU-LE BAUT C., 1990. Les polychlorobiphényles (PCB) en milieu marin. Biogéochimie et écotoxicologie. Rapport Scientifique et Technique n° 18, IFREMER.
- METCALFE C.D., 1989. Tests for predicting carcinogenicity in fish. *Rev. Aquat. Sci.* 1, 111.
- METCALFE, C.D., 1990. Chemical contaminants and fish tumors. *Sci. Total Environ.*, 94, 1.
- MICHEL X.R., CASSAND P.M., RIBERA D.G. & NARBONNE J.F., 1992. Metabolism and mutagenic activation of benzo(a)pyrene by subcellular fractions from mussel (*Mytilus galloprovincialis*) digestive gland and sea bass (*Discenthrarcus labrax*) liver. *Comp. Biochem. Physiol.*, 103C, 43.



- MICHEL X., 1993. Contribution à l'étude des interactions entre les contaminants chimiques organiques et les organismes marins : bases moléculaires et applications à la biosurveillance de l'environnement côtier. Thèse, Université Bordeaux I.
- MILLER J.A. & MILLER E.C., 1977. Ultimate chemical carcinogens as reactive mutagenic electrophiles, in *Origins of Human Cancer*, Hiatt, H.H., Watson J.D. & Winsten J.A., Eds., Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation, Vol. 4, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 605.
- MILLER E.C. AND MILLER J.A., 1981. Mechanisms of chemical carcinogenesis. *Cancer*, 47, 1055.
- MILLER E.C. & MILLER J.A., 1985. Some historical perspectives on the metabolism of xenobiotic chemicals to reactive electrophiles, in *Bioactivation of Foreign Compounds*, M.W. Anders Ed., Orlando FL, Academic Press, pp. 3-28.
- MILLER M.R., HINTON D.E. & BLAIR J.B., 1989. Characterization of BNF-inducible cytochrome P450IA1 in cultures of rainbow trout liver cells. *Mar. Environ. Res.*, 28, 105.
- MINIER C., AKCHA F. & GALGANI F., 1993. P-glycoprotein expression in *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* in polluted seawater. *Comp. Biochem. Physiol.*, 106B, 4, 1029-1036.
- MINIER C., 1994. Recherche de biomarqueurs de toxicité liés à l'activité estérase non-spécifique et à la résistance multi-xénobiotique chez divers organismes marins. Thèse, Université de Nantes.
- MIRANDA C.L., WANG J.L., HENDERSON M.H. & BUHLER D.R., 1990. Immunological characterization of constitutive isozymes of cytochrome P450 from rainbow trout. Evidence for homology with phenobarbital-induced rat P450s. *Biochim. Biophys. Acta*, 1037, 155.
- MIX M.C., 1986. Cancerous diseases in aquatic animals and their association with environmental pollutants : a critical review of the literature. *Mar. Environ. Res.*, 20, 1.
- MOORE M.J., 1991. Vacuolation, proliferation and neoplasia in the liver of winter flounder *Pseudopleuronectes americanus*, from Boston Harbor, Massachusetts. Technical Report, 91-28, Woods Hole Oceanographic Institution, Woods Hole, MA.
- MOORE M.N. AND EVANS B., 1992. Detection of ras oncoprotein in liver cells of flatfish (dab) from a contaminated site in the North Sea. *Mar. Environ. Res.*, 34, 33.
- MOORE M.J. & MYERS M.S., 1994. Pathobiology of chemical-associated neoplasia in fish, in *Aquatic Toxicology* (D.C. Malins, G.K. Ostrander eds), Lewis Publishers.

- MORGENSTERN R., LUNDQVIST G., ANDERSSON C. & MOSIALOU E., 1990. Membrane bound glutathione S-transferase : function and properties, in *Glutathione S-Transferases and Drug Resistance*, Hayes J.D., Pickett C. and Mantle T.J., Eds., Taylor and Francis, London, p. 57.
- MORIARTY F., 1983. Ecotoxicology : the study of pollutants in ecosystems. Academic Press, 1st Ed., Londres.
- MUENCH K.F., MISRA R.P. AND HUMAYUN M.Z., 1983. Sequence specificity in aflatoxin B1-DNA interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80, 6.
- MUNSCHY C., 1995. Comportement géochimique des herbicides et de leurs produits de dégradation en milieu estuarien et côtier. Thèse, Université Paris 6.
- MURCHELANO R.A. & WOLKE R.E., 1985. Epizootic carcinoma in the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Science*, 228, 587.
- MURCHELANO R.A. & WOLKE R.E., 1991. Neoplasms and nonneoplastic liver lesions in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, from Boston Harbor, Massachusetts. *Environ. Health Perspect.*, 90, 17.
- MYERS M.S., LANDAHL J.T., KRAHN M.M., JOHNSON L.L. & MCCAIN B.B., 1990. Overview of studies on liver carcinogenesis in English sole from Puget Sound ; evidence for a xenobiotic chemical etiology. 1. Pathology and epizootiology. *Sci. Total Environ.*, 94, 33.
- MYERS M.S., LANDAHL J.T., KRAHN M.M. & MCCAIN B.B., 1991. Relationships between hepatic neoplasms and related lesions and exposure to toxic chemicals in marine fish from the U.S. West Coast. *Environ. Health Perspect.*, 90, 7.
- MYERS M.S., RHODES L.R. & MCCAIN B.B., 1987. Pathologic anatomy and patterns of occurrence of hepatic neoplasms, putative preneoplastic lesions and other idiopathic hepatic conditions in English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, Washington. *J. Natl. Cancer Inst.*, 78.
- MYERS M.S., STEHR C.S., OLSON O.P., JOHNSON L.L., MCCAIN B.B., CHAN S.L. & VARANASI U., 1994. Relationships between toxicopathic hepatic lesions and exposure to chemical contaminants in English sole (*Pleuronectes vetulus*), starry flounder (*Platichthys stellatus*) and white croaker (*Genyohemus lineatus*) from selected marine sites on the Pacific Coast, U.S.A. *Env. Health Perspect.*, 102, 1.
- NARBONNE J. F., RIBERA D., MICHEL X., RAOUX C., GARRIGUES P., MONOD J.L., LEMAIRE P., GALGANI F., ROMEO M., SALAÜN J.P. & LAFAURIE M., 1991. Indicateurs biochimiques de contamination de l'environnement marin : etude comparative en mer Méditerranée. *Oceanis*, 17, 3, 257-275.
- NEBERT D.W. *et al.*, 1987. The P450 Gene Superfamily : Recommended Nomenclature, *DNA*, 6, 1-11.

- NEBERT D.W., NELSON D., COON M., ESTABROOK R., FEYEREISEN R., FUJII-KURIYAMA Y., GONZALEZ F., GUENGERICH F., GUNSALUS I., JOHNSON E., LOPER J., SATO R., WATERMAN M. & WAXMAN D., 1991. The P450 superfamily : update on new sequences, gene mapping and recommended nomenclature, *DNA Cell Biol.*, 10, 1-14.
- NELSON D.R., KAMATAKI T., WAXMAN D.J., GUENGERICH F.P., ESTABROOK R.W., FEYEREISEN R., GONZALEZ F.J., COON M.J., GUNSALUS I.C., GOTOH O., OKUDA K. & NEBERT D.W., 1993. The P450 superfamily - update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.*, 12, 1.
- NEMOTO N., KODAMA K., TAZAWA A., PRINCE MASAHITO AND ISHIKAWA T., 1986. Extensive sequence homology of the goldfish ras gene to mammalian ras gene. *Differentiation*, 32, 17.
- NIIMI A.J., 1986. Biological half-lives of chlorinated diphenyl ethers in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquat. Toxicol.* 9, 105.
- O'BRIEN R.D., 1967. In *Insecticides - Action and Metabolism*, Academic Press, New-York.
- OCDE, 1995. Lignes directrices pour les essais de produits chimiques / Aquatic Testing Methods for Pesticides and Industrial Chemicals, detailed review paper prepared for the national coordinators of the OECD test guidelines programme.
- OLSSON P.E., HAUX C. & FORLIN L., 1987. Variations in hepatic metallothionein, Zinc and Copper levels during an animal reproductive cycle in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Fish Physiol. Biochem.*, 3, 39-47.
- OMURA T. & SATO R., 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 239, 2370.
- ORTIZ DE MONTELLANO P.R., 1986. *Cytochrome P-450. Structure, Mechanism and Biochemistry*, New York, Plenum Press.
- OSTRANDER G.K., SHIM J.K., HAWKINS W.E. AND WALTER W.W., 1992. A vertebrate model for investigations of retinoblastoma. *Proc. 83rd Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res.*, 33, 109.
- OZATO K. AND WAKAMATSU Y., 1983. Multi-step regulation of oncogene expression in fish hereditary melanoma. *Differentiation*, 24, 181.
- PARK S., MILLER H., KLOTZ A., KLOEPPER-SAMS P., STEGEMAN J. & GELBOIN H., 1986. Monoclonal antibodies to liver microsomal cytochrome P-450-E of the marine fish *Stenotomus chrysops* (Scup). *Arch. Biochem. Biophys.*, 249, 339.
- PAYNE J.F. & PENROSE W.P., 1975. Induction of aryl hydrocarbon hydroxylase in fish by petroleum. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 14, 112.
- PAYNE J.F., 1976. Field evaluation of benzopyrene hydroxylase induction as a monitor for marine pollution. *Science*, 191, 945.

- PAYNE J.F., FANCEY L.L., RAHIMTULA A.D. & PORTER E.L., 1987. Review and perspective on the use of mixed-function oxidase enzymes in biological monitoring. *Comp. Biochem. Physiol.*, 86, 233-245.
- PESONEN M. & ANDERSSON T., 1991. Characterization and induction of xenobiotic metabolizing enzyme activities in a primary culture of rainbow trout hepatocytes. *Xenobiotica*, 21, 461.
- PETERLE T.J., 1969. DDT in antarctic snow. *Nature*, 224, 620.
- PFEIFER G.P., GRUNGERGER D. AND DRAHOVSKY D., 1984. Impaired enzymatic methylation of BPDE-modified DNA. *Carcinogenesis*, 5, 931-935.
- PHILIP D.H. & SIMS P., 1979. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites : their reactions with nucleic acids, in *Chemical Carcinogens and DNA*, Vol. 2, P.L. Grover, Ed., CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 29-57.
- PICKETT C.B. & LU A.Y.H., 1989. Glutathione S-transferases : gene structure, regulation and biological function. *Annu. Rev. Biochem.*, 58, 743.
- PIERCE K.V., McCAIN B.B. & WILLINGS S.R., 1978. Pathology of hepatomas and other liver abnormalities in english sole (*Parophrys vetulus*) from the Duwamish river estuary, Seattle, Washington. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 50, 1445-1449.
- POIRIER M.C., 1984. The use of carcinogen-DNA adduct antisera for quantitation and localization of genomic damage in animal models and the human population. *Environ. Mutagenesis*, 6, 879-887.
- PORTE C., SOLE M., ALBAIGES J. & LIVINGSTONE D.R., 1991. Responses of mixed-function oxygenase and antioxidase enzyme system of *Mytilus* sp. to organic pollution, *Comp. Biochem. Physiol.*, 100C, 183.
- PORTER W.P., HINS DILL R., FAIRBROTHER A., OLSON L.J., JAEGER J., YUILL T., BISGAARD S, HUNTER W.G. & NOLAN K., 1984. Toxicant-disease-environment interactions associated with suppression of immune system, growth and reproduction. *Science*, 224, 1014-1017.
- POULOS T.L. & RAGG R., 1992. Cytochrome P450cam : crystallography, oxygen activation and electron transfer. *FASEB J.*, 6, 674.
- QUINIOU F. & TOULARASTEL F., 1991. Biological effects of contaminated water tested by marine bivalve embryo-bioassay. Proceedings of the FAO/UNEP/IOC, Workshop on the biological effects of pollutants on marine organisms, Malta, 10-14 Septembre.
- QUINIOU F., LE SQUER-ANDRE .E, N. DAMEE, 1993. Effet de sédiments marins et de leurs extraits aqueux sur la bioluminescence d'une bactérie (Microtox®) et sur le développement embryonnaire de bivalves. ICES Statutory Meeting.

- QUINIOU F. *et al*, 1995a. Bivalve embryo bioassay to assess the potential toxicity of dredged material before dumping. Second SETAC (Society of Environmental Toxicology And Chemistry) World Congress, Vancouver, Canada, 5–9 November
- QUINIOU F., JUDAS A., LE SQUER-ANDRE E., 1995b. Toxicité potentielle des eaux et des sédiments des principaux estuaires de la rade de Brest évaluée par 2 bioessais. 3èmes Rencontres Scientifiques Internationales. Programme Rade de Brest, 14–16 Mars.
- RAHN R., CHANG S., HOLLAND J.M. AND SHUGART L.R., 1982. A fluorimetric-HPLC assay for quantitating the binding of benzo[a]pyrene metabolites to DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 109, 262–269.
- RAMADE F., 1989. *Eléments d'écologie : écologie appliquée*. Mc Graw Hill.
- RAMADE F., 1992. *Précis d'écotoxicologie*. Masson, Paris.
- RATTNER B.A., HOFFMAN D.J. & MARN C.M., 1989. Use of mixed-function oxygenases to monitor contaminant exposure in wildlife. *Environ. Toxicol. Chem.*, 8, 1093–1102.
- RAZIN A. AND RIGGS A.D., 1980. DNA methylation and gene function. *Science*, 210, 604–609.
- REICHERT W.L. & VARANASI U., 1987. Detection of damage by <sup>32</sup>P-analysis of hepatic DNA in English sole from an urban area and in fish exposed to chemicals extracted from the urban sediment. *Proc. Am. Assoc. Cancer. Res.*, 28, 95.
- RHODES L.D., MYERS M.S., GRONLUND W.D. & McCAIN B.B., 1987. Epizootic characteristics of hepatic and renal lesions in English sole, *Parophrys vetulus*, from Puget Sound. *J. Fish. Biol.*, 31, 395.
- RNO . Travaux du RNO (Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin, IFREMER-Ministère de l'environnement, Editions 1988, 1989–90, 1991, 1992–93, 1994, 1995.
- ROBOHM R.A., 1986. Paradoxical effects of cadmium exposure on antibacterial antibody responses in two fish species : inhibition in cunners (*Tautogolaburs adspersus*) and enhancement in striped Bass (*Morone saxatilis*). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 12, 251–262.
- ROESIJADI B. & SPIES R.B., 1988. *Marine Environmental Research*, Vol. 24, Essex, England, Elsevier Applied Science.
- SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S., MULLIS K.B. AND ERLICH H.A., 1988a Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487–491.

- SAIKI R.K., CHANG C., LERENSON C.H., WARREN T.C., BOEHM C.D., KAZAZIAN H.H. AND ERLICH H.A., 1988b Diagnosis of sickle cell anemia and  $\beta$ -thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *N. Engl. J. Med.*, 319, 537-541.
- SAKAI N., TANAKA M., ADACHI S. MILLER W.L. & NAGAHAMA Y., 1992. Rainbow trout cytochrome - P-450c17 (17-alpha-Hydroxylase/17,20-Lyase) - cDNA cloning, enzymatic properties and temporal pattern of ovarian P-450c17 messenger RNA expression during oogenesis. *FEBS Lett.*, 301, 60.
- SANDERS B.M., 1988. The role of the stress proteins response in physiological adaptation of marine molluscs, *Mar. Envir. Res.*, 24, 207-210.
- SANDERS B., 1990. Stress proteins : potential as multitiered biomarkers, in *Biomarkers of environmental contamination*, J.F. Mc Carthy, L.R. Shugart, Eds, Lewis Publishers.
- SANTELLA R.M., 1988. Application of new techniques for the detection of carcinogen adducts to human population monitoring. *Mutat. Res.*, 205, 271-282.
- SCHANKER L.S., TOCCO D.J., BRODIE B.B. & HOGBEN A.M., 1958. Absorption of drugs from the rat small intestine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 123, 81.
- SCHARTL M., 1990. Homology of melanoma-inducing loci in the genus *Xiphophorus*. *Genetics*, 126, 1083.
- SCHLENK D. & D.R. BUHLER, 1989. Determination of multiple forms of cytochrome P-450 in microsomes from the digestive gland of cryptochiton stelleri. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 163, 476-480.
- SCHLENK D., 1993. A comparison of endogenous and exogenous substrates of the flavin-containing monooxygenases in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.*, 26, 157.
- SCHLESINGER M.J., ASHBURNER M. & TISSIERES A., 1982. *Heat shock from bacteria to man*, Cold Spring Harbor, NY.
- SCHMIDT W., 1976. The micronucleus test for cytogenetic analysis, in *Chemical mutagens : Principles and methods for their detection*, vol. 6, A. Hollaender, Ed., New-York, Plenum Press, 1976, pp. 31-53.
- SEMBA K., YAMANASHIY., NISHIZAWA M., SUKEGAWA J., YOSHIDA M., SASAKI M., YAMAMOTO T. AND TOYOSHIMA K., 1986. yes-related protooncogene *fyn*, belongs to the protein-tyrosine kinase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83, 5459.
- SHARMA R.P., 1981. *Immunologic Considerations in Toxicology*, Vols. I and II, Boca Raton, FL, CRC Press, Inc.).

- SHUGART L., McCARTHY J., JIMENEZ B. & DANIELS J., 1987. Analysis of DNA adduct formation in the Bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) between benzo(a)pyrene and DNA of the liver and hemoglobin of the erythrocyte. *Aquat. Toxicol.*, 9, 319-325.
- SHUGART L.R., 1990. 5-methyl deoxycytidine content of DNA from bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) exposed to benzo[a]pyrene. *Environ. Toxicol. Chem.*, 9, 205-208.
- SHUGART L., BICKHAM J., JACKIM G., MC MAHON G., RIDLEY W., STEIN J. AND SREINERT S., 1992. DNA alterations, in *Biomarkers. Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*, R.J. Huggett, R.A. Kimerle, P.M. Mehrle Jr and H.L. Bergman, Eds, A special publication of SETAC, Lewis Publishers.
- SIKKA H.C., RUTKOWSKI J.P., KANDASWAM C., KUMAR S., EARLEY R. & GUPTA R.C., 1990. Formation and persistence of DNA adducts in the liver of brown bullheads exposed to benzo(a)pyrene. *Cancer Lett.*, 49, 81-87.
- SINNHUBER R.O., 1968. Aflatoxin in cottonseed meal and liver cancer in rainbow trout, in *Trout Hepatom Research Conference Papers*, Halver, J.E. and Mitchell, I.A., Eds., Research Report # 70, U.S. Fish and Wildlife Service, Washington, D.C., 48.
- SINNHUBER R.O., WALES J.L., AYRES J.L., ENGBRECHT R.H. & AMEND D.L. 1968. Dietary factors and hepatomas in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). I. Aflatoxins in vegetable protein feedstuffs. *J. Natl. Cancer Inst.*, 41, 711.
- SMITH C.E., PECK T.H. , KLAUDA R.J. & McCLAREN J.B., 1979. Hepatomas in atlantic tomcod *Microgadus tomcod* (Walbaum), collected from the Hudson River estuary in New York. *J. Fish Dis.*, 2, 313-319.
- SONSTEGARD R.A. & LEATHERLAND J.F., 1984. Comparative epidemiology : the use of fishes in assessing carcinogenic contaminants, in *Contaminant Effects on Fisheries*, Cairns V.W., Hodson P.V. & Nriagu J.O., Eds. *Adv. Environ. Sci. Technol.*, 16, 223.
- SOUSSI T., CARON DE FROMENTEL C. AND MAY P., 1990. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene*, 5, 945.
- SPITSBERGEN J.M., SCHAT K.A., KLEEMAN J.M. & PETERSON R.E., 1986. Interactions of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) with immune responses of Rainbow Trout. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 12, 263-280.
- STANTON M.F., 1965. Diethylnitrosamine-induced hepatic degeneration and neoplasia in the aquarium fish, *Brachydanio rerio*. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 34, 117.
- STEGEMAN J.J., 1981. Polynuclear aromatic hydrocarbons and their metabolism in the marine environment, in *Polycyclic Hydrocarbons and Cancer*, Gelboin, H.V. & Ts'O, P.O.P., Eds., Academic Press, New York, p. 1.

- STEGEMAN J.J., SKOPECK T.R. & THILLY W.G., 1982. Bioactivation of polynuclear aromatic hydrocarbons to cytotoxic and mutagenic products by marine fish, in *Carcinogenic Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in the Marine Environment*, U.S. Environmental Protection Agency, Gulf Breeze, FL.
- STEGEMAN J.J., KLOEPPER-SAMS P.J. & FARRINGTON J.W., 1986. Monooxygenase induction and chlorobiphenyls in the deep-sea fish *Coryphaenoides armatus*. *Science*, 231, 1287.
- STEGEMAN J.J., 1987. Monooxygenase systems in marine fish. in *Pollutant Studies in Marine Animals*, Giam, C.S. and Ray, L.E., Eds., CRC Press, Boca Raton, FL, p. 65.
- STEGEMAN J.J., 1989a. Cytochrome P-450 forms in fish : catalytic, immunological and sequence similarities. *Xenobiotica*, 19, 1093.
- STEGEMAN J.J., 1989b. Monooxygenase Systems in Marine Fish, in *Pollutant Studies in Marine Animals*, C.S. Giam, and L. Ray, Eds., Boca Raton, FL, CRC Press, pp. 65-92.
- STEGEMAN J.J., 1992. Nomenclature for hydrocarbon inducible cytochrome P450 in fish. *Mar. Environ. Res.*, 34, 133.
- STEGEMAN J.J. et al, 1992. Molecular responses to environmental contamination : enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect, in *Biomarkers, Biochemical, Physiological and Histological markers of anthropogenic stress*, Lewis Publishers.
- STEGEMAN J.J., 1993. Cytochrome P450 forms in fish, in *Cytochrome P450, Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 105, Schenkman, J.B. and Greim, H., Eds., Springer-Verlag, Berlin, p.105.
- STEGEMAN J.J., MILLER M.J., WOODIN B.R. & BLAIR J.D., 1993. Effect of  $\beta$ -naphthoflavone on multiple cytochrome P450 forms in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. *Mar. Environ. Res.*, 35, 209.
- STEGEMAN J.J. & HAHN M.E., 1994. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases : current perspectives on forms, functions and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In "*Aquatic Toxicology. Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*", D.C. Malins, G.K. Ostrander, Eds, Lewis Publishers.
- STEWART H.L., WILLIAMS G.L., KEYSSER C.H., LOMBARD L.S. & MONTALI R.J., 1980. Histologic typing of liver tumors in the rat. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 64, 179.
- STOLEN J.S., FLETCHER T.C., ANDERSON D.P., ROBERSON B.S. & VAN MUISWINKEL W.B., 1990. *Techniques in Fish Immunology*, Fair Haven, NJ, SOS Publications.
- STOLER A.B., 1991. Genes and cancer. *Br. Med. Bull.*, 47, 64.



- TAKAHASHI M., TANAKA M., SAKAI N., ADACHI S., MILLER W.L. & NAGAHAMA Y., 1993. Rainbow trout ovarian cholesterol side-chain cleavage cytochrome-P450 (P450 scc) - cDNA cloning and messenger RNA expression during oogenesis. *FEBS Lett.*, 319, 45.
- TAN B. & MELIUS P., 1986. Polynucleas aromatic hydrocarbon metabolism in fishes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 83C, 217.
- TANABE S., MARUYAMA K. & TATSUKAWA R., 1982. Absorption efficiency and biological half-life on individual chlorobiphenyls in carp (*Cyprinus carpio*) orally exposed to Kanechlor products. *Agric. Biol. Chem.*, 46, 891.
- TANAKA M., TELECKY T.M., FUKUDA S., ADACHI S. & CHEN S., 1992. Cloning and sequence analysis of the cDNA encoding P-450 aromatase (P450arom) from a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovary : relationship between the amount of P450arom mRNA and the production of oestradiol-17 $\beta$  in the ovary. *J. Mol. Endocrinol.*, 8, 53.
- THIBAUD Y. & ALZIEU C., 1980. Teneurs en métaux et en composés organochlorés d'organismes marins prélevés en baie de Seine. Rapport ISTPM, Laboratoire Micropolluants Organiques.
- THOMSON A.B.R. & DIETSCHY J.M., 1981. Intestinal lipid absorption : major extracellular and intracellular events, in *Histology of the Gastrointestinal Tract*, Johnson, L.R., Ed., Raven Press, New York, p. 1147.
- TRIEFF N.M., ROMANA L.A., ESPOSITO A., ORAL R., QUINIOU F., IACCARINO M., ALCOK N., RAMANUJAM V.M.S. & PAGANO G., 1995. Effluent from bauxite factory induces developmental and reproductive damage in sea Urchins. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 28, 173-177.
- TRONCZYNSKI J., MUNSCHY C., DURAND G. & BARCELO D., 1993. Monitoring of trace levels of herbicides and their degradation products in the river Rhône, France, by gas chromatography mass spectrometry. *Sci. Total Environ.*, 132, 327-337.
- TRONCZYNSKI J., MUNSCHY C. & MOISAN K., 1994. Transport and fate of triazine herbicides in the French estuaries. ACS Publication, San Diego, CA, USA.
- TRONCZYNSKI J., 1995. Etude des contaminants organiques dans l'estuaire de la Seine. Premier rapport scientifique IFREMER, UPMC.
- VAN BENEDEN R.J., 1994. in *Biochemistry and molecular biology of fishes*, P.W. Hochachka and T.P. Mommsen, Eds, Elsevier, Amsterdam.
- VAN BENEDEN R.J., WATSON R.J., CHEN D.K., LAUTENBERGER J.A. AND PAPAS T.S., 1986. Cellular myc (c-myc) in fish (rainbow trout) : its relationship to other vertebrate myc genes and to the transforming genes of the MC29 family of viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83, 3698.

- VAN VELD P.A., 1990. Absorption and metabolism of dietary xenobiotics by the intestine of fish. *Rev. Aquat. Sci.* 2, 185.
- VARANASI U. & GMUR D.J., 1980. Metabolic activation and covalent binding of benzo(a)pyrene to deoxyribonucleic acid catalyzed by liver enzymes of marine fish. *Biochem. Pharmacol.*, 29, 753.
- VARANASI U., REICHERT W.L., Le EBERHART B.T. & STEIN J.E., 1986. Formation and persistence of benzo[a]pyrene–diolepoxide–DNA adducts in liver of English sole (*Parophrys vetulus*). *Chem. Biol. Interact.*, 69, 203.
- VARANASI U., STEIN J.E., NISHIMOTO M., REICHERT W.L. & COLLIER T.K., 1987. Chemical carcinogenesis in feral fish : uptake, activation, and detoxification of organic xenobiotics. *Environ. Health Perspect.*, 71, 155.
- VARANASI U., 1989. *Metabolism of Polyaromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*, CRC Press, Boca Raton, FL.
- VARANASI U., REICHERT W.L., Le EBERHART B.T. & STEIN J.E., 1989a. Adducts in liver of wild English sole (*Parophrys vetulus*) and winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Cancer Res.*, 49, 1171.
- VARANASI U., REICHERT W.L., EBERHART B.L. & STEIN J.E., 1989b. Formation and persistence of benzo(a)pyrene–diol epoxide–DNA adducts in livers of english sole (*Parophrys vetulus*). *Chem. Biol. Interact.*, 69, 203–216.
- VEITH G.D., KUEL D.W., LEONARD E.N. *et al.*, 1979. Fish, wildlife and estuaries : PCB and others organic chemical residues in fish from major watersheds of the US, *Pestic. Monitor Journ.*, 13, 1–12.
- VERSTEEG D.J., 1985. Lysosomal membrane stability, histopathology and serum enzyme activities as sublethal bioindicators of xenobiotic exposure in the bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus* Rafinesque), PhD thèse, Michigan State University, East Lansing, MI.
- VETHAAK A.D. & RHEINALLT T., 1992. Fish disease as a monitor for marine pollution : the case for the North Sea. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 2, 1.
- VIELKIND J.R., KALLMAN K.D. AND MORIZOT D.C., 1989. Genetics of melanomas in Xiphophorus fishes. *J. Aquat. Anim. Health*, 1, 69.
- VINCENT F., JAUNET S., GALGANI F., BESSELINK H. & KOEMAN J., 1995. Expression of ras gene in flounder (*Platichthys flesus*) and red mullet (*Mullus barbatus*). *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 215, 2,659–665.
- VINCENT F., CHEREL Y. & GALGANI F., 1996. Mutation of ras proto–oncogene in *Callionymus lyra* liver hyperplasia. soumis.
- VOLGEBEIN W.K., FOURNIE J.W., VELD P.A.V. & HUGGETT R.J., 1990. Hepatic neoplasms in the mummichog *Fundulus heteroclitus* from a creosote–contaminated site. *Cancer. Res.* 50, 5978.

- VOS J.G., 1977. Immune suppression as related to toxicology. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 5, 67–101.
- VOS J.G., 1980. Immunotoxicity assessment : screening and function studies. *Arch. Appl. Toxicol. Suppl.*, 4, 95–108.
- WEEKS B.A., HUGGETT R.J., WARINNER J.E. & MATHEWS E.S., 1990. Macrophage responses estuarine fish as bioindicators of toxic contamination, in *Biomarkers of Environmental Contamination*, J.F. McCarthy & L.R. Shugart, Eds., Boca Raton, FL, Lewis Publishers, pp. 193–201.
- WEEKS B.A. *et al*, 1992. Immunological biomarkers to assess environmental stress, in *Biomarkers. Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*, Lewis Publishers.
- WEINBERG R.A., 1988. Finding the anti-oncogene. *Sci. Am.*, 259, 44.
- WEINBERGER C., THOMPSON C.C., ONG E.S., LEBO R., GRUOL D.J. AND EVANS R.M., 1986. The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature*, 324, 641.
- WELCH W.J., 1990. The mammalian stress response : cell physiology and biochemistry of stress proteins, in *The role of the stress response in biology and disease*, R. Maromoto and Tissières A., Eds, Cold Spring Harbor Laboratory.
- WELLINGS S.R., 1968. Neoplasia and primitive vertebrate phylogeny : echinoderms, prevertebrates, and fishes – a review. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 31, 59.
- WHYTE P., BUCHKOVITCH J.J., HORORWITZ J.M., FRIENDS S.H., RAYBUCK M., WEINBERG R.A. AND HARLOW E., 1988. Association between an oncogene and anti-oncogene : the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature*, 334, 124.
- WILLIAMS R.T., 1959. In *Detoxication. Mechanisms*, 2nd ed, Chapman & Hall, London.
- WILLIAMS D. & BUHLER D., 1982. Purification of cytochromes P-448 from  $\beta$ -naphthoflavone-treated rainbow trout. *Biochim. Biophys. Acta.*, 717, 398.
- WILLIAMS D.E. & BUHLER D.R., 1983. Purified form of cytochrome P-450 from rainbow trout with high activity toward conversion of aflatoxin B1 to aflatoxin B1-2,3epoxide. *Cancer, Res.*, 43, 4752.
- WILSON V.L. AND JONES P.A., 1983. Inhibition of DNA methylation by chemical carcinogens *in vitro*. *Cell*, 32, 229–246.
- WIRGIN I.I., CURRIE D., GORUNWALD C. AND GARTE S.Y., 1989a. Molecular mechanisms of carcinogenesis in a natural population of Hudson river fish. *Proc. AACR Mtg*, 30, 194.
- WIRGIN I., CURRIE D. AND GARTE S.J., 1989b. Activation of the K-ras oncogene in liver tumors of Hudson River tomcod. *Carcinogenesis*, 10, 2311.

- WITTBRODT J., ADAM D., MALITSCHKE B., MÄUELER W., RAULF F., TELLING A., ROBERTSON S.M. AND SCHARTL M., 1989. Novel putative receptor tyrosine kinase encoded by the melanoma-inducing Tu locus in *Xiphophorus*. *Nature*, 341, 415.
- WOLL S., 1994. Test des micronoyaux sur les hémocytes de *Mytilus galloprovincialis* : essai d'application à la surveillance du littoral méditerranéen français. Mémoire en vue de l'obtention du titre d'Ingénieur, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand.
- WOOTTON A.N., HERRING C., SPRY J.A., WISEMAN A., LIVINGSTONE D.R. & GOLDFARB P.S., 1993. Evidence for the existence of cytochrome P450 gene families, CYP1A1, 3A, 4A1, 11A1 in the common mussel, *Mytilus edulis* L., Seventh International Symposium on Responses of Marine Organisms to Pollutants.
- WRISBERG M.N., 1990. Induction of micronuclei in hemocytes of *Mytilus edulis*. Physiological and biochemical approaches to the toxicological assessment of environmental pollution, ESCPB, Utrecht, 27-31 August 1990.
- ZARBL H., SUKUMAR S., ARTHUR A.V., MARTIN-ZANCA D. AND BARBACID M., 1985. *Nature*, 315, 382-385.
- ZECHEL C., SCHLEENBECKER U., ANDERS A., PFÜTZ M. AND ANDERS F., 1989. Search for genes critical for the early and/or late events in carcinogenesis : studies in *Xiphophorus* (Pisces, Teleostei), in *Modern Trends in Human Leukemia VIII*, R. Neth, C.R. Gallo, M.F. Greaves, G. Gaedicke and J. Ritter, Eds, Springer-Verlag, Berlin, p.366
- ZECHEL C., PETER H., SCHLEENBECKER H., ANDERS A. AND ANDERS F., 1992. Erb-B\*<sup>a</sup> : an ignition spark for the *Xiphophorus* melanoma machinery?, in *Haematology and Blood Transfusion*, vol. 35 : *Modern Trends in human Leukemia VIII*, R. Neth, C.R. Gallo, M.F. Greaves, G. Gaedicke and J. Ritter, Eds, Springer-Verlag, Berlin, p. 213.
- ZEEMAN M.G. & BRINDLEY W.A., 1981. Effects of Toxic Agents on Fish Immune Systems : A review, in *Immunologic Considerations in Toxicology*, Vol II, R.P. Sharma, Ed. (Boca Raton, FL : CRC Press, Inc.).
- ZIEGLER D.M., 1988. Flavin-containing monooxygenases : catalytic mechanisms and substrate specificities. *Drug Metab. Rev.*, 6, 1.
- ZIEGLER D.M. & MITCHELL C.H., 1990. Microsomal oxidase IV : properties of a mixed function amine oxidase isolated from pig liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 150, 116.
- ZIEGLER D.M., 1990. Flavin-containing monooxygenases : enzymes adapted for multisubstrate specificity. *Trends Pharmacol. Sci.*, 11, 321.

# **Annexe 1**

## **Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de toxicologie génétique\***

*\* tiré de lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economiques), Paris, 1995.*



LIGNES DIRECTRICES DE L'OCDE  
POUR LES ESSAIS DE PRODUITS CHIMIQUES

---

**INTRODUCTION AUX LIGNES DIRECTRICES DE L'OCDE  
POUR LES ESSAIS DE TOXICOLOGIE GÉNÉTIQUE  
ET ORIENTATIONS POUR LE CHOIX  
ET L'UTILISATION DES ESSAIS**

**Table des Matières**

	Page
1. Préambule	1
2. Qu'est-ce que la toxicologie génétique ?	1
3. Qu'est-ce que des mutations ?	2
3.1 Comment les mutations se produisent-elles ?	2
3.2 Classification des mutations	3
3.2.1 Mutations ponctuelles ou géniques	3
3.2.2 Les mutations chromosomiques (aberrations structurales)	4
3.2.3 Mutations génomiques (aberrations numériques)	4
4. Quelles sont les conséquences des mutations ?	5
4.1 Les mutations des cellules germinales	5
4.2 Mutations somatiques et cancers	6
5. Le choix des essais de toxicologie génétique	7
5.1 Essais relatifs aux mutations géniques	9
5.2 Essais relatifs aux mutations chromosomiques	9
5.3 Essais relatifs aux effets sur l'ADN	10
5.4 Quelle est la valeur relative de ces essais ?	10
5.5 Acceptabilité scientifique des essais et des résultats	11
5.6 Intégrité génétique des cellules et des organismes d'essai	11
5.7 Transformation biologique et métabolisme	12
5.8 Influence de la structure du produit chimique à étudier	12
5.9 Biodisponibilité	13
5.10 L'utilisation de témoins et la vérification des essais	14

---

<b>6. Comment les essais sont-ils appliqués en pratique ?</b>	<b>14</b>
6.1 Détection de l'activité mutagène	15
6.2 Prédiction de l'activité cancérogène	15
6.3 Remarques d'ordre pratique :	
l'utilisation des essais en « batteries » ou en « séries »	18
<b>Références</b>	<b>20</b>
<b>Ouvrages recommandés</b>	<b>21</b>
<b>Appendice. Liste des participants aux réunions d'experts de l'OCDE tenues à Wädenswil, Suisse, en septembre 1985, Londres en février et novembre 1982, Washington DC en juin 1981 et Tokyo en octobre 1980.</b>	<b>22</b>

---

# **INTRODUCTION AUX LIGNES DIRECTRICES DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE TOXICOLOGIE GÉNÉTIQUE ET ORIENTATIONS POUR LE CHOIX ET L'UTILISATION DES ESSAIS**

## **1. Préambule**

Des Lignes directrices pour les essais de toxicologie génétique ont été établies, sous forme de projet, par des experts des pays Membres au cours de cinq réunions successives qui ont eu lieu en octobre 1980 à Tokyo, en juin 1981 à Washington DC, en février et en novembre 1982 à Londres et en septembre 1985 à Wädenswil, Suisse. Le Conseil de l'OCDE a adopté les Lignes directrices 471 à 474 en 1983, 475 à 478 en 1984, 479 à 485 en 1986.

Le texte qui suit, présenté en tant qu'introduction aux Lignes directrices pour les essais de toxicologie génétique, est destiné à fournir des orientations succinctes et utiles aux utilisateurs de ces Lignes directrices. Il reflète l'état d'avancement des essais de toxicologie génétique en 1986. Des méthodes nouvelles ainsi que celles déjà existantes sont constamment remises en question et évaluées quant à leur importance relative.

Ce texte expose l'opinion circonstanciée des experts qui ont participé à la réunion de Wädenswil. Il ne reflète pas nécessairement les vues de l'OCDE ou de ses pays Membres.

## **2. Qu'est-ce que la Toxicologie Génétique ?**

Le développement de la toxicologie génétique répond à la crainte que certains produits chimiques, connus pour induire des mutations dans divers systèmes expérimentaux, puissent éventuellement modifier la fréquence des maladies héréditaires chez l'homme. Il s'est confirmé, par la suite, que de nombreux produits chimiques qui provoquent des cancers ont une activité mutagène, et une bonne part des essais qui sont décrits dans les Lignes directrices, et constituent la base des essais de toxicologie génétique, servent à étudier à la fois l'activité mutagène et l'éventuelle activité cancérogène des produits chimiques. Les produits chimiques qui exercent leurs effets néfastes en interagissant avec le matériel génétique des cellules, c'est-à-dire avec l'ADN (acide désoxyribonucléique), et en altérant sa structure et/ou ses fonctions sont dits « génotoxiques ».



### 3. Qu'est-ce que des mutations ?

Une mutation est une modification du contenu informatif du matériel génétique, qui est transmise aux générations suivantes de cellules ou d'individus. Une mutation se produit spontanément ou peut être induite par des agents physiques ou chimiques variés et peut affecter des cellules aussi bien germinales que somatiques.

Dans un organisme vivant, ces modifications peuvent se manifester par des altérations de la structure des protéines, risquant d'entraîner une modification ou une suppression de l'activité enzymatique. Comme, dans bien des cas, les mutations perturbent le fonctionnement, elles sont, en général, préjudiciables aux organismes dans lesquels elles apparaissent, et seule une faible fraction d'entre elles peuvent apporter un certain avantage.

En dépit des différences d'une espèce à l'autre dans le métabolisme, dans la réparation de l'ADN et dans les autres processus physiologiques qui influent sur l'induction de mutations par des produits chimiques, la quasi-universalité de l'ADN en tant que matériel génétique justifie l'utilisation de systèmes d'essai aussi divers que des bactéries, des insectes, des cultures de cellules de mammifères et des animaux entiers pour prévoir le pouvoir mutagène intrinsèque des produits chimiques mis à l'essai. Un autre argument en faveur de l'utilisation de systèmes non humains est que l'on a remarqué que les produits chimiques ayant des effets génétiques sur une espèce ou un système d'essai provoquent fréquemment des effets similaires sur d'autres espèces ou d'autres systèmes.

#### 3.1. Comment les mutations se produisent-elles ?

L'ADN contient de nombreux sites capables de réagir et sa structure peut être modifiée de maintes façons. Pour devenir héréditaire, une telle modification doit être « fixée » d'une façon ou d'une autre avant qu'elle puisse conduire à un changement du contenu informatif d'un gène et se transmettre aux générations futures de cellules ou individus. Une fois qu'une cellule a subi une lésion primaire de son ADN, elle peut y répondre de différentes façons, mais seule la troisième réponse (c), telle que décrite ci-après, peut aboutir à la « fixation » de l'altération prémutationnelle, devenue ainsi une mutation :

- a) La cellule peut réparer la lésion et ramener la molécule d'ADN à son état initial ; dans ce cas, il ne se produira aucune mutation.
- b) La cellule peut mourir, par exemple si la lésion de l'ADN empêche la réplication, auquel cas la mutation ne risque pas de se manifester.

- c) La cellule peut être capable de réparer l'ADN lésé, mais sans le ramener à son état d'origine. Elle peut également faire des erreurs pendant la réplication de l'ADN lésé. Ces processus peuvent conduire à des altérations stables de la séquence de nucléotides qui peuvent être transmises comme mutations aux cellules de la descendance.

Certains produits chimiques sont capables d'induire des mutations sans que l'on puisse mettre en évidence une liaison covalente avec l'ADN, par exemple par intercalation, et des mutations génomiques peuvent résulter d'interactions avec d'autres cibles que l'ADN, par exemple le fuseau mitotique.

## 3.2. Classification des mutations

Des modifications du contenu informatif de l'ADN ou de son organisation peuvent se produire de différentes façons et à différents niveaux, allant de la modification d'un seul nucléotide dans un codon à des changements dans le nombre de la série complète des chromosomes dans un noyau. On peut donc répartir les mutations en trois grandes classes : a) les mutations ponctuelles ou géniques, b) les mutations chromosomiques et c) les mutations génomiques. A propos de cette classification, il convient de noter que l'ADN bactérien se présente comme une molécule circulaire unique, ramassée sous la forme d'un noyau qui n'est pas enfermé dans une membrane, c'est-à-dire que les bactéries n'ont pas un vrai noyau et sont classées parmi les procaryotes. L'ADN des eucaryotes, comme celui des levures, des végétaux, des insectes, des animaux, etc. est organisé en chromosomes qui sont regroupés dans un noyau distinct enveloppé d'une membrane nucléaire.

### 3.2.1. Mutations ponctuelles ou géniques

Les mutations ponctuelles ou géniques sont des modifications d'une ou de quelques séquences de nucléotides d'un segment codant à l'intérieur d'un gène. Elles peuvent consister en substitution de bases (c'est-à-dire le remplacement d'une base d'ADN par une autre), ou en l'addition ou la délétion d'une ou de plusieurs bases, ce qui altère la séquence des bases dans l'ADN et modifie par conséquent le cadre de lecture de l'ARN (acide ribonucléique) ; il s'agit alors de mutations du cadre de lecture. Les mutations ponctuelles qui imposent l'insertion d'un acide aminé « incorrect » dans un polypeptide sont dites mutations « faux sens ». Elles s'expriment en général par des affaiblissements fonctionnels de l'organisme atteint, comme une altération de la croissance ou une sensibilité accrue à la température. Les mutations géniques

qui convertissent des codons correspondant à des acides aminés précis en codons de terminaison entraînent un arrêt prématuré de la synthèse du polypeptide et sont dites mutations « non-sens ». Ces mutations se caractérisent généralement par l'arrêt total du fonctionnement du gène touché.

Les mutations qui résultent dans la perte de la fonction normale d'un produit génique sont appelées mutations directes. Une mutation qui restaure la fonction d'un gène ayant subi une mutation est appelée mutation réverse. Des organismes simples comme les bactéries fournissent des exemples de mutations directes et réverses. Une mutation directe d'un gène qui commande la synthèse d'un acide aminé dans une bactérie peut rendre nécessaire la présence de cet acide aminé dans le milieu de culture. Une mutation réverse qui restaure, dans une cellule de bactérie auxotrophe, la fonction d'un gène précédemment muté, restaure la possibilité de croissance sans l'apport extérieur du produit nutritif préalablement requis.

### **3.2.2. Les mutations chromosomiques (aberrations structurales)**

Les mutations chromosomiques se caractérisent par des modifications morphologiques de la structure globale des chromosomes, c'est-à-dire des aberrations dans l'organisation structurale normale du chromosome. On détecte habituellement ces aberrations chromosomiques en examinant au microscope des cellules colorées et fixées au stade de la métaphase de leur division. Les aberrations résultent de la cassure et de la recombinaison de matériel chromosomique durant le cycle cellulaire et comprend les inversions du matériel chromosomique et les translocations de ce matériel d'un chromosome à un autre. La perte ou le déplacement de matériel génétique au cours de ces processus peut avoir des conséquences dramatiques sur l'expression des gènes et, dans bien des cas, les mutations chromosomiques sont létales pour la cellule où elles se produisent.

### **3.2.3. Mutations génomiques (aberrations numériques)**

Les mutations génomiques consistent en modifications du nombre des chromosomes et sont également appelées aberrations numériques. Le génome normal diploïde est euploïde ( $n \times 2$ ) et contient une série complète de chromosomes provenant de chaque parent. Il y a polyploïdie lorsque le génome haploïde est multiplié par un facteur différent de deux ( $n \times 8$ , par exemple). Dans le cas de la perte ou du gain d'un chromosome au cours de la division cellulaire, on parle d'aneuploïdie. L'addition d'un chromosome dans un génome diploïde conduit à la trisomie alors que la perte d'un chromosome aboutit à la monosomie.

S'il est possible d'identifier des mutations ponctuelles dans des organismes aussi simples que les bactéries, il faut par contre utiliser des organismes à structure chromosomique eucaryote pour détecter des mutations chromosomiques ou génomiques.

#### **4. Quelles sont les conséquences des mutations ?**

##### **4.1. Les mutations des cellules germinales.**

Les mutations sont responsables de troubles variés dans la population humaine et elles peuvent être ponctuelles, chromosomiques et génomiques.

Les effets des mutations ponctuelles diffèrent suivant qu'elles touchent des gènes dominants d'un autosome (observables quand un seul gène mutant est présent), comme dans le cas de la chorée de Huntington, ou des gènes récessifs d'un autosome (observables uniquement lorsque les deux exemplaires d'un gène mutant sont présents), comme dans le cas de la maladie de Tay-Sachs.

Des mutations chromosomiques très diverses s'observent à la fois dans les naissances normales et les avortements spontanés. D'après les estimations, des altérations structurales ou numériques des chromosomes sont présentes dans environ 0,6 pour cent des naissances normales, et dans 40 pour cent des avortements spontanés. Jusqu'à 40 pour cent des anomalies structurales sont dues à de nouvelles mutations.

Les mutations génomiques chez l'être humain comprennent plusieurs trisomies, dans lesquelles les individus touchés possèdent trois et non deux exemplaires d'un chromosome particulier. Citons comme exemples le syndrome de Down (ou plus communément trisomie 21), le syndrome de Klinefelter (XXY), celui d'Edwards (trisomie 18) et celui de Patau (trisomie 13), toutes ces anomalies étant préjudiciables à la santé de l'individu atteint. Pratiquement tous ces syndromes sont des mutations génomiques nouvelles, qui se sont produites dans les cellules germinales de la génération précédente.

Les mutations dominantes qui entraînent une mort précoce ou interdisent la reproduction ne sont pas transmises. En revanche, les mutations qui ne s'expriment que tard dans la vie, comme la chorée d'Huntington, seront transmises et marqueront les générations suivantes. Au contraire, les mutations récessives ne seront pas apparentes dans une population tant qu'elles seront présentes sous forme hétérozygote, c'est-à-dire tant que les individus porteront un seul exemplaire du gène mutant ; elles ne s'exprimeront et ne seront visibles que dans les cas d'homozygotie, c'est-à-dire lorsqu'un individu aura deux exemplaires d'un gène portant une mutation récessive.

On peut donc distinguer les mutations dominantes ou récessives selon le rythme auquel elles modifient une population. Les effets des nouvelles mutations dominantes doivent apparaître à la première génération qui suit leur induction, alors que les mutations récessives peuvent avoir besoin de plusieurs générations avant de pouvoir s'exprimer. Dans une population, les augmentations constatées dans la fréquence des mutations manifestement dominantes sont le reflet direct de l'induction de telles mutations dans les gamètes parentaux. En revanche, la fréquence des caractéristiques récessives dans une population reflète les mutations accumulées depuis de nombreuses générations avant que l'état homozygote ne soit atteint.

Actuellement, il n'existe aucune preuve directe indiquant que des produits chimiques peuvent provoquer des mutations chez l'homme, pas plus qu'il n'existe de procédé permettant de mesurer l'induction de mutations dans les cellules germinales humaines. Il est par conséquent difficile d'évaluer la part de maladies humaines attribuable à des mutations nouvelles. L'induction de mutations par des agents physiques et chimiques dans une grande variété d'espèces permet cependant de conclure que les humains peuvent eux aussi être sensibles à l'induction de mutations par des agents de l'environnement.

#### **4.2. Mutations somatiques et cancers**

Les cancers se développent, estime-t-on, suivant une série d'étapes dont deux au moins sont identifiables expérimentalement. Puisqu'il a été démontré qu'une proportion non négligeable de produits chimiques cancérigènes endommageaient l'ADN et provoquaient des mutations, on considère que la première étape du processus, appelée initiation, consiste en une mutation de cellules somatiques. L'observation de conditions génétiquement déterminées prédisposant au cancer et d'anomalies chromosomiques caractéristiques de certains cancers, le caractère héréditaire de quelques variétés de cancers, l'origine clonale des tumeurs et l'activation des proto-oncogènes cellulaires sont autant d'indications du rôle crucial des mutations dans le processus d'initiation. La transformation des cellules initiées (mutées) en un état malin ou cancéreux dépend d'autres stades dont on pense ordinairement qu'ils comprennent la promotion et la progression, et dont les mécanismes sont moins bien connus.

Il a été montré qu'une part importante de cancérigènes chimiques provoquent des lésions de l'ADN ainsi que des mutations géniques et chromosomiques. Il existe cependant d'autres cancérigènes, tels que les hormones, certains métaux, des agents physiques inertes et certains

autres produits chimiques, qui sont présumés causer le cancer par des mécanismes autres que l'interaction avec l'ADN ou d'autres macromolécules cellulaires. De tels cancérrogènes ne sont généralement pas décelés dans les essais de génotoxicité.

## 5. Le choix des essais de toxicologie génétique

La première fonction des essais de pouvoir mutagène est d'étudier, en utilisant des cellules ou des organismes d'essai, la capacité des substances chimiques d'induire, chez l'homme, des mutations qui peuvent être transmises par les cellules germinales aux futures générations. Les procédures décrites dans les Lignes directrices de l'OCDE peuvent être utilisées à cet effet. De façon générale les données scientifiques viennent appuyer l'hypothèse selon laquelle le stade d'initiation de la cancérogénèse comprend une lésion de l'ADN dans des cellules somatiques. Une telle lésion peut conduire à des mutations et des essais pour déterminer l'activité mutagène peuvent aussi identifier les produits chimiques qui sont capables de provoquer un cancer. Ainsi, certains essais repris dans les Lignes directrices sont utiles pour explorer une activité cancérogène supposée.

Si, lors d'essais classiques de toxicologie (aiguë ou chronique), on peut relever plusieurs paramètres ou effets intéressants avec un seul protocole expérimental, cette possibilité se présente rarement en toxicologie génétique. La diversité des effets génétiques empêche généralement d'en détecter plus d'un avec un seul système d'essai. De plus, les essais nécessaires pouvant être différents d'une famille de produits chimiques à une autre, il faut donc disposer de toute une gamme de systèmes d'essai. Cela permet d'appliquer une stratégie souple et de choisir les méthodes les plus appropriées à des situations spécifiques.

Les Lignes directrices proposent environ quinze essais différents. Certains sont plus largement utilisés que d'autres, et la présente section de ce document est destinée à fournir des orientations pratiques aux utilisateurs de ces essais en fonction des connaissances et de l'expérience que l'on possède actuellement, ainsi que de l'acceptation de ceux-ci. Un certain nombre de facteurs guident le choix des essais qui répondent le mieux à un besoin précis. Ces facteurs comprennent la nature du changement génétique qu'il faut détecter, la capacité métabolique du système d'essai suivant la structure du produit chimique à étudier, l'utilisation envisagée pour ce produit, l'ampleur prévue de l'exposition et de la répartition, la valeur prédictive de l'essai en terme de pouvoir mutagène et cancérogène, les compétences et les installations disponibles et, si besoin est, les prescriptions des autorités réglementaires.

Il convient de souligner qu'il n'existe pas d'accord universel sur la meilleure façon de combiner les essais dans un but particulier, bien que divers organismes nationaux et internationaux aient tenté d'harmoniser le choix des essais les plus appropriés. Il est à noter également qu'il existe d'autres essais sur le pouvoir mutagène en utilisation ou en cours de mise au point, qui, en l'absence d'une Ligne directrice de l'OCDE, peuvent également être utiles.

Comme on l'a vu précédemment, des produits chimiques réagissant avec l'ADN y créent des lésions qui, après le déroulement de divers processus de réparation, peuvent aboutir, au niveau du gène, à des modifications génétiques comme des mutations ponctuelles ou géniques, de petites délétions, des recombinaisons mitotiques ou diverses modifications chromosomiques visibles au microscope, et on dispose d'essais pour identifier chacun de ces événements.

#### **Tableau 1. Classification générale des essais**

##### **Essais relatifs aux mutations génétiques.**

Essai de mutation réverse sur *Salmonella typhimurium* 471).

Essai de mutation réverse sur *Escherichia coli* (472).

Essai de mutation génique sur des cellules de mammifères en culture (476).

Essai de mutation létale récessive liée au sexe chez *Drosophila melanogaster* (477).

Essai de mutation génique sur *Saccharomyces cerevisiae* (480).

« Spot test » chez la souris (484).

##### **Essais relatifs aux aberrations chromosomiques.**

Essai cytogénétique *in vitro* (473).

Essai cytogénétique *in vivo* (475).

Essai du micronucléus (474).

Essai de mutation létale dominante (478).

Essai de translocation héréditaire chez la souris (485).

Essai cytogénétique de cellules germinales de mammifère (483).

##### **Essais relatifs aux effets sur l'ADN**

Lésion et réparation de l'ADN - Synthèse non programmée de l'ADN *in vitro* (482).

Essai de recombinaison mitotique sur *Saccharomyces cerevisiae* (481).

Essai *in vitro* d'échange de chromatides-sœurs (479).

### 5.1. Essais relatifs aux mutations géniques.

Pour déceler les mutations géniques induites par des produits chimiques, les essais les plus largement utilisés sont ceux qui utilisent des bactéries (471, 472). Ils sont relativement simples à réaliser, reproductibles, et fournissent des données fiables sur la capacité d'un produit chimique d'agir sur l'ADN et de provoquer des mutations. Cependant, les bactéries sont des organismes très simples, et le résultat positif d'un essai sur bactérie ne signifie pas nécessairement que le composé produira des effets similaires sur des cellules animales ou d'autres cellules eucaryotes. De même, un résultat négatif ne signifie pas invariablement que le composé n'a pas d'activité mutagène sur des cellules eucaryotes ou sur des mammifères intacts.

Afin d'obtenir des données sur les mutations ponctuelles dans les cellules eucaryotes, on dispose, pour une première sélection, d'un choix de systèmes d'essai, comprenant certaines méthodes utilisant des levures (480), des cultures de cellules de mammifères (476) et les drosophiles (477). Les mutations ponctuelles somatiques peuvent être étudiées chez des mammifères à l'aide du spot test chez la souris (484).

### 5.2. Essais relatifs aux aberrations chromosomiques.

Les essais les plus simples et les plus sensibles pour étudier les effets clastogènes (c'est-à-dire cassures de chromosomes) sont ceux qui se réalisent sur des cultures de cellules de mammifères (473). Ces tests permettent d'identifier les produits chimiques capables d'endommager des chromosomes de mammifères dans un système expérimental *in vitro*. Pour rechercher si un produit chimique est capable d'endommager les chromosomes d'un mammifère vivant, on dispose de deux méthodes *in vivo* bien établies. Les propriétés clastogènes d'un produit chimique dans des cellules somatiques peuvent être étudiées sur des cellules de la moelle osseuse de rongeurs, chez lesquels, après leur avoir administré le produit chimique suspect, on compte les micronucléus dans les érythrocytes polychromatiques (474) ou on analyse les chromosomes des cellules en métaphase (475). Ces deux essais peuvent aussi servir pour rechercher les modifications du nombre de chromosomes (comme l'aneuploïdie), bien qu'il n'existe pas à l'heure actuelle de Ligne directrice pour un essai spécifique de l'aneuploïdie. D'autre part, on peut détecter les produits chimiques susceptibles d'endommager les chromosomes des cellules germinales en utilisant l'essai sur la mutation létale dominante (478), un essai sur les aberrations chromosomiques structurales dans les spermatogonies (483) ou, dans certains cas, l'essai sur la translocation héréditaire chez la souris (485). L'essai sur la translocation héréditaire est le seul de ces essais qui puisse révéler les altérations réellement transmissibles chez un animal vivant.



### 5.3. Essais relatifs aux effets sur l'ADN

Trois Lignes directrices de l'OCDE décrivent des méthodes qui sont généralement acceptées comme essais pouvant montrer les effets sur l'ADN induits par des produits chimiques. Une des réponses de la cellule à de telles atteintes est l'initiation de la réparation enzymatique de la lésion, qui comprend la dégradation de la partie endommagée et ensuite la synthèse d'un segment, relativement court, d'ADN pour remplacer la région atteinte. Une telle réparation, appelée « synthèse non programmée d'ADN » ou « UDS » (pour la différencier de la synthèse qui a lieu au cours de la duplication normale de la cellule), est à la base de l'essai d'UDS sur les cultures de cellules de mammifères (482).

On peut étudier les crossing-over mitotiques (échanges de segments d'ADN entre des gènes ou entre un gène et son centromère) et la conversion génique (transfert de segments d'ADN à l'intérieur d'un gène) chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (481) ; ces phénomènes sont considérés comme des indicateurs utiles d'une lésion primaire de l'ADN. L'étude de l'échange de chromatides sœurs dans des cultures de cellules de mammifères (479) entre aussi dans cette catégorie d'essais. Le mécanisme moléculaire de la formation d'un échange de chromatides sœurs reste encore à élucider parfaitement, mais on a montré qu'il était différent du mécanisme aboutissant à la cassure de chromosomes, et l'essai d'échange de chromatides sœurs est une méthode utile pour identifier les produits chimiques qui affectent l'ADN.

### 5.4. Quelle est la valeur relative de ces essais ?

Les essais de toxicologie génétique décrits dans les Lignes directrices utilisent des espèces variées et le tableau 2 donne la classification des essais en fonction de leur utilité et de leur application. La valeur relative de ces essais pour prédire les effets éventuels sur l'homme dépend de nombreux facteurs, mais, en général, plus le système d'essai ressemble à l'être humain, plus grande est la valeur prédictive de ses résultats. Ainsi, on estime en général que les essais *in vivo* ont une plus grande valeur que les essais *in vitro*. Il en est de même pour les essais sur des eucaryotes par rapport aux essais sur des procaryotes et les essais sur des mammifères par rapport aux essais sur des espèces autres que des mammifères. Un autre facteur général influant sur la capacité de prévoir les effets mutagènes est le type de cellule étudié dans l'essai de toxicologie génétique. D'ordinaire, les essais réalisés sur des cellules germinales présentent davantage d'intérêt pour la prévision d'effets sur les cellules germinales chez l'homme que les essais réalisés sur des cellules somatiques.

### **5.5. Acceptabilité scientifique des essais et des résultats**

Avant qu'un essai puisse être utilisé en toute confiance, il doit être reconnu comme une méthode acceptable pour la détection de produits chimiques génotoxiques. La cellule cible de l'essai, que ce soit une bactérie, une levure ou une cellule animale, doit être parfaitement caractérisée, tant génétiquement que biologiquement, de façon à assurer qu'elle se comportera de la façon prévue dans le système expérimental qui l'utilisera. Deuxièmement, le système doit être capable de maintenir la cellule cible dans les meilleures conditions expérimentales et faire en sorte que le produit chimique d'essai sous sa forme la plus réactive puisse atteindre la molécule cible (par exemple l'ADN) dans la cellule. Troisièmement, il faut prouver que l'essai est « solide », c'est-à-dire qu'il est parfaitement reproductible, et que les données obtenues dans différents laboratoires sont comparables. Les Lignes directrices de l'OCDE pour les essais ont été établies pour des essais réputés remplir ces conditions générales.

### **5.6. Intégrité génétique des cellules et des organismes d'essai.**

Les caractéristiques génétiques fondamentales des cellules cibles utilisées dans les essais sur des bactéries et des levures sont décrites en détail dans les Lignes directrices correspondantes et dans la bibliographie qui les accompagne. Ces textes fournissent également des indications relatives au maintien de l'intégrité génétique des souches proposées. Ces indications détaillées doivent être respectées fidèlement pour faire en sorte que la structure génétique des organismes d'essai répond aux besoins d'un essai donné. Par exemple, les souches de salmonelles habituellement utilisées dans les essais bactériens répondent à différents types de mutagènes, et la gamme des souches choisies doit permettre la détection de ces différents mutagènes, par exemple de ceux qui provoquent un décalage du cadre de lecture et de ceux qui provoquent une substitution de paires de bases. De même, les souches de levure ont été spécialement choisies pour correspondre à des phénomènes génétiques et il est essentiel de confirmer que les souches utilisées conviennent bien aux objectifs précis. Les mêmes principes s'appliquent aux essais sur des drosophiles, pour lesquels on utilise des colonies de souches appropriées correctement entretenues.

La situation est légèrement différente pour les essais sur des cellules de mammifères. Les types de cellules décrites dans les Lignes directrices pour les essais sont, en général, choisies à l'aide de techniques de culture de tissus par clonage, de telle façon qu'ils remplissent les conditions requises par les modifications génétiques à mettre en évidence. Par exemple, les lignées cellulaires établies, qui servent aux essais cytogénétiques ou à l'essai d'échange de

chromatides sœurs (473, 479), sont sélectionnées et cultivées de façon à maintenir l'intégrité du nombre de chromosomes. Les cellules utilisées dans les essais de mutation génétique (476) doivent être sensibles à un certain type de mutation induite (par exemple au locus HPRT) et des cultures ayant une faible fréquence de mutation spontanée doivent être utilisées pour étudier les produits chimiques.

Les animaux utilisés dans des études *in vivo* doivent être maintenus dans des conditions adéquates d'hébergement, d'éclairage et de nourriture. Seuls des animaux sains seront utilisés. Souvent on ne prescrit pas de lignées spécifiques d'animaux de laboratoire, mais pour certaines méthodes comme le spot test chez la souris (484), l'équipement génétique de la lignée testée joue un rôle capital.

### **5.7. Transformation biologique et métabolisme**

Nombre de produits chimiques cancérigènes ou mutagènes ne peuvent réagir avec l'ADN avant d'avoir été, dans une certaine mesure, transformés biologiquement sous l'effet d'enzymes. Chez les mammifères, l'homme y compris, les produits chimiques étrangers à l'organisme sont modifiés par une série de réactions enzymatiques et non enzymatiques destinées à détoxifier le produit chimique et à le transformer en une forme soluble dans l'eau qui pourra être éliminée par l'organisme. Ces réactions enzymatiques peuvent aussi activer certaines molécules capables d'interagir avec l'ADN pour provoquer des lésions qui peuvent être dangereuses. Les systèmes enzymatiques appropriés peuvent être partiellement ou totalement inactifs ou même absents dans la bactérie, la levure ou les cultures de cellules de mammifères et on les y introduit généralement sous la forme d'une fraction de foie de mammifère, riche en enzymes et dépourvue de cellules.

### **5.8. Influence de la structure du produit chimique à étudier**

Les procédures décrites dans les Lignes directrices pour les essais sont conçues de façon à offrir des conditions expérimentales quasi optimales pour les essais de la majorité des catégories de produits chimiques. Étant donné la variété de structure et la réactivité des produits chimiques, il faut admettre que ces procédures, notamment pour les essais *in vitro*, sont en fait des compromis, et que, dans bien des cas, elles ne sont pas nécessairement les meilleures pour le produit chimique particulier à étudier. La nature et la vitesse des réactions enzymatiques qui amènent un produit chimique pro-mutagène à sa forme réactive finale dépendent de la structure de ce produit. Les enzymes fournies par la fraction de foie ordinairement incorporée dans les essais *in vitro*, c'est-à-dire surtout des oxydases à fonction mixte, sont capables d'activer la

plupart des pro-mutagènes. Les conditions expérimentales, notamment l'origine (espèce, tissu), la quantité de fraction microsomique et la proportion de co-facteurs, peuvent devoir être ajustées afin de réaliser des conditions quasi optimales pour une classe donnée de produits chimiques. Par exemple, l'essai standard salmonelle/microsomes peut mettre en évidence la plupart des amines aromatiques, des hydrocarbures polycycliques, des agents alkylants mono- ou bi-fonctionnels et des mycotoxines, mais il doit être modifié pour convenir à quelques nitrosamines, aux colorants azo et à certains autres composés. Quelques-uns, comme le dichloro-1,2-éthane, sont activés par conjugaison avec le glutathion ; dans ce cas, un système métabolique exogène peut ne pas offrir les meilleures conditions d'activation. De plus, les composés activés par les enzymes non présentes dans la préparation microsomique de foie, par exemple celles de la flore intestinale, ne seront pas détectés. Ces considérations s'appliquent à tous les essais pour lesquels on doit utiliser des systèmes enzymatiques métabolisants exogènes. Pour certains produits chimiques, les enzymes endogènes résiduelles présentes dans les cultures de cellules de mammifères sont plus actives que le mélange d'enzymes microsomiques que l'on ajoute. Dans des conditions appropriées, et, dépendant de son état, la levure *Saccharomyces cerevisiae* possède des activités oxydases mixtes. Des essais avec cet organisme nécessitent cependant l'incorporation de préparations de foie de mammifère.

Bien que, comme on l'a vu plus haut, les procédures recommandées pour les essais *in vitro* représentent un compromis dans la conception de l'expérience, dans la pratique, on peut obtenir, en les appliquant, des résultats fiables avec la plupart des produits chimiques. Mais lors de l'interprétation des résultats, il est essentiel de tenir compte de l'influence éventuelle de la structure du produit chimique pour déterminer si la procédure expérimentale choisie convient à ce produit.

## 5.9. Biodisponibilité

La voie d'administration des produits chimiques est un élément important dans la conception des études *in vivo*. Lorsqu'une étude vise à établir si le composé possède des propriétés mutagènes propres, c'est-à-dire à déterminer son pouvoir mutagène potentiel, alors une voie parentérale (par exemple intrapéritonéale, intraveineuse) est ordinairement utilisée pour que l'absorption soit maximale. Si, en revanche, on souhaite recueillir des informations à partir desquelles on évaluera un éventuel danger pour la santé humaine, alors la voie doit être semblable à celle que le produit empruntera chez l'homme.

### **5.10. L'utilisation de témoins et la vérification des essais.**

Des produits témoins positifs doivent être essayés en même temps que la substance testée dans chacun des essais *in vitro* et ces composés devront comprendre des produits directement actifs et des produits nécessitant une activation métabolique. A l'exception de l'essai sur la translocation héréditaire, de l'essai de la mutation létale dominante et du « mouse spot test », pour lesquels des données historiques de référence fournies par des témoins sont acceptables, il faudra également utiliser concurremment des témoins positifs dans les procédures *in vivo*. Dans tous les cas, les produits chimiques choisis comme témoins positifs devront être utilisés à des doses ou à des concentrations appropriées et faibles permettant de montrer la sensibilité de l'essai.

Les témoins négatifs peuvent consister en cellules ou en organismes non traités ou traités par le solvant (véhicule), ou des deux à la fois. Ils doivent être incorporés à chaque essai. Dans certains systèmes d'essai *in vivo*, comme l'essai sur la translocation héréditaire, l'essai de la mutation létale dominante chez le rongeur et le spot test chez la souris, on pourra augmenter la valeur statistique de l'essai en utilisant en plus des données historiques obtenues avec des témoins négatifs, à condition que ces données soient homogènes.

Pour faire en sorte que les résultats soient cohérents, il convient de répéter les essais *in vitro* et, lorsqu'il y a lieu, les Lignes directrices le précisent.

## **6. Comment les essais sont-ils appliqués en pratique ?**

Étant donné le nombre de tests de mutagénèse utilisés couramment, une grande variété de schémas d'application des essais destinés à l'étude des produits chimiques a été proposé. Pour plus de facilité, on peut les répartir en deux groupes, l'approche séquentielle ou par phases et l'approche par ensemble prédéterminé d'opérations. L'approche par phases consiste en une série logique d'essais, débutant généralement par deux ou trois essais *in vitro*, suivis par une seconde phase d'essais *in vitro* et/ou *in vivo*, dont le choix est souvent déterminé par les résultats des essais initiaux. La seconde approche consiste en un ensemble prédéterminé d'essais *in vitro* et *in vivo* effectués en parallèle. La base de données résultant de ces essais est alors considérée dans son ensemble. Dans les deux cas, les résultats des essais sur le pouvoir mutagène sont étudiés en prenant également en considération les résultats provenant d'autres études de toxicité et de pharmacocinétique.

### 6.1. Détection de l'activité mutagène.

L'évaluation de l'activité mutagène d'un produit chimique suppose, en premier lieu, de rechercher s'il est capable d'interagir avec l'ADN et d'induire une modification détectable dans le matériel génétique. On a conçu à cette fin des essais sur des bactéries, des levures, des champignons, des drosophiles et également des essais *in vitro* sur des cellules de mammifères. Ces essais ne permettent pas de prévoir avec un haut degré de certitude si un produit chimique provoquera des mutations chez un mammifère tel que l'homme. Pour avoir une idée de l'activité du produit chimique chez l'animal vivant, on utilise des méthodes *in vivo* où le produit est administré à des animaux par une voie appropriée, et on détecte les modifications génétiques par divers moyens (comme l'étude chromosomique des cellules de la moelle osseuse, l'essai de mutation létale dominante ou le spot test chez la souris).

Les mutations des cellules germinales peuvent avoir des effets d'une portée considérable sur les générations à venir et il est essentiel de pouvoir prévoir si un produit chimique présente ce danger. Les seules méthodes applicables pour étudier directement les modifications génétiques des cellules germinales sont limitées aux lésions chromosomiques, comme les essais de mutation létale dominante (478), de cytogénétique des cellules germinales (483) et de translocation héréditaire (485). Il est généralement admis, en l'absence de la preuve du contraire, que les produits chimiques connus pour induire des lésions chromosomiques dans les cellules germinales de mammifères sont capables de causer des dommages similaires dans des cellules germinales humaines. Des résultats négatifs obtenus lors de tels essais sur un produit connu comme clastogène dans d'autres essais peuvent également présenter un très grand intérêt. Les méthodes existantes ne peuvent, à l'exception des expériences animales à grande échelle comme les essais sur le locus spécifique de la souris, être extrapolées directement à l'étude de l'induction de mutations géniques des cellules germinales humaines.

### 6.2. Prédiction de l'activité cancérogène.

Les essais actuels à court terme ne peuvent, bien sûr, reproduire tous les stades du processus cancérogène et il est fréquemment admis qu'ils ne peuvent détecter que l'événement conduisant à la phase d'initiation, c'est-à-dire la capacité d'induire une lésion de l'ADN, par mutation ou cassure. Le principal intérêt de ces méthodes est qu'elles permettent d'identifier des produits chimiques capables, dans certaines conditions d'exposition, de provoquer un cancer par un mécanisme principalement génétoxique ou d'induire la phase initiale du processus cancérogène. Comme on l'a vu précédemment, les produits activateurs de la cancérogénèse (1), notamment les composés dits promoteurs de tumeurs, échapperont généralement à la détection par les essais classiques basés sur une action sur l'ADN. Il apparaît, étant donné la complexité

du processus cancérogène par rapport à la simplicité relative des essais à court terme, que, même si ces essais fournissent d'utiles informations qualitatives, leur interprétation en termes d'activité cancérogène nécessite la plus grande prudence.

La valeur prédictive des essais à court terme pour la détection des cancérogènes potentiels est d'ordinaire déterminée d'après les résultats obtenus dans des études de validation, au cours desquelles une gamme de produits chimiques connus, cancérogènes et non cancérogènes, est essayée dans des conditions contrôlées. Par exemple, l'essai de mutation réverse sur salmonelle (471) a été soumis à un certain nombre de telles études ; la précision avec laquelle il permet de différencier entre cancérogènes et non cancérogènes se situe entre 60 et 90 pour cent et dépend, entre autres facteurs, de la nature des produits chimiques choisis pour l'étude (2). Des facteurs techniques influent aussi sur sa précision et il est essentiel, lorsque l'on étudie des résultats provenant d'essais sur des bactéries (et autres essais), que la procédure expérimentale soit adaptée au type de produit chimique étudié (voir ci-après).

L'induction de lésions de structure chromosomique est également une propriété commune à de nombreux produits chimiques cancérogènes et des études récentes ont montré que quelques cancérogènes qui n'induisent pas de mutations dans des systèmes bactériens peuvent provoquer des lésions chromosomiques dans des cultures de cellules de mammifères (3, 4, 5, 6, 7). On estime donc que la combinaison d'un essai de mutation chez les bactéries avec un essai de mutation chromosomique sur des cultures de cellules possède une plus grande valeur prédictive pour l'activité cancérogène que l'un des deux essais réalisés isolément (3, 4, 8).

Les essais qui portent sur les lésions de l'ADN, comme l'essai de recombinaison mitotique chez la levure (481), l'échange de chromatides sœurs dans des cellules animales (479) et la synthèse d'ADN non programmée (482), ont aussi fourni de précieuses informations prévisionnelles sur le pouvoir cancérogène. Des résultats positifs dans ces essais indiquent en général qu'un produit chimique peut agir sur l'ADN dans une cellule eucaryote, mais ils ne permettent pas de déterminer si la lésion induite est capable d'évoluer en véritable mutation somatique ou en événement d'initiation cancérogène. Néanmoins, de tels essais fournissent d'utiles éléments complémentaires lorsque l'on établit les caractéristiques génotoxiques générales des effets néfastes que peut avoir un produit chimique.



**Tableau 2. Utilité et application des essais**

**Essais pouvant être utilisés pour dépister des produits mutagènes et cancérogènes.**

Essai de mutation réverse sur *Salmonella typhimurium* (471).  
Essai de mutation réverse sur *Escherichia coli* (472).  
Essais *in vitro* de mutation génique sur des cellules de mammifères (476).  
*Saccharomyces cerevisiae*, essai de mutation génique (480).  
Essai cytogénétique *in vitro* sur cellules de mammifères (473).  
Lésion et réparation d'ADN - Synthèse non programmée d'ADN (482).  
Essai *in vitro* d'échange de chromatides-sœurs (479).  
*Saccharomyces cerevisiae*, essai de recombinaison mitotique (481).  
Essai cytogénétique *in vivo* (475).  
Essai du micronucléus (474).  
Essais de mutation létale récessive liée au sexe chez *Drosophila* (477).

**Essais confirmant l'activité *in vitro*.**

Essai cytogénétique *in vivo* (475).  
Essai du micronucléus (474).  
Spot test chez la souris (484).  
Essais de mutation létale récessive liée au sexe chez *Drosophila* (477).

**Essais applicables à l'évaluation des effets sur les cellules germinales et à l'estimation des risques génétiques.**

Essai de mutation létale dominante (478).  
Essai de translocation héréditaire (485).  
Essai cytogénétique sur cellules germinales de mammifère (483).



En raison des différences physiologiques et génétiques qui existent entre les bactéries et les cellules eucaryotes, il est inévitable que certains produits chimiques provoquent des mutations géniques chez les bactéries et pas chez les eucaryotes (l'inverse est très rare). Chez les eucaryotes, des essais de mutation génique réalisés sur des cellules de mammifères (476) ou sur des levures (480) peuvent fournir d'utiles données complémentaires sur de tels produits chimiques.

### **6.3. Remarques d'ordre pratique : l'utilisation des essais en « batteries »**

Les essais de toxicologie génétique sont effectués de façon à produire des résultats sur l'activité d'un composé jusqu'à ce que l'on ait atteint un niveau permettant d'évaluer les risques mutagènes et carcinogènes éventuels avec un degré de confiance acceptable. Puisqu'aucun essai à lui seul ne s'est révélé capable de détecter les agents mutagènes et carcinogènes pour les mammifères avec suffisamment de précision et de reproductibilité, la pratique usuelle consiste à effectuer des essais en « batteries ». Pour ce faire il existe deux façons d'opérer : dans l'une il est procédé par étapes successives et, dans l'autre, tous les essais d'une batterie choisie à l'avance sont effectués en parallèle.

Des organismes nationaux ou internationaux ont recommandé des stratégies variées pour l'utilisation des essais de toxicologie génétique et proposé des batteries comprenant deux à cinq essais. De telles batteries comportent des essais sur des cellules procaryotes et eucaryotes et couvrent les principales modifications génétiques que l'on peut attendre. Le choix des essais et leur portée peuvent être influencés par la nature du produit à étudier, l'ampleur de sa diffusion et de son utilisation, les résultats provenant d'autres essais toxicologiques et d'études pharmacocinétiques et, dans certains cas, les compétences techniques disponibles.

Une première information sur le pouvoir mutagène d'un produit chimique peut être obtenue à partir d'essais relatifs aux mutations géniques et d'essais relatifs aux effets chromosomiques. Au moins deux essais sont nécessaires car la détermination de chacun de ces effets nécessite l'utilisation d'une méthode différente. D'ordinaire, l'un est un essai sur bactérie, utilisant une gamme de souches de *Salmonella typhimurium* (471), et l'autre porte sur l'induction d'aberrations chromosomiques. Ce dernier peut être un essai du micronucléus (474), ou une analyse des chromosomes de cellules de la moelle osseuse de rongeurs en métaphase (475) ou, plus souvent, un essai chromosomique sur des cultures de cellules de mammifères (473). A condition de prendre totalement en considération les propriétés physico-chimiques et le comportement métabolique des produits chimiques à étudier, la plupart des mutagènes et des

cancérogènes génotoxiques potentiels seront détectés par une combinaison de l'essai de mutation réverse chez la salmonelle (471) et de l'essai chromosomique *in vitro* sur des cellules de mammifères (473) (3, 4, 6, 7, 8).

Quelques autorités préfèrent la mise en œuvre d'une batterie différente ou plus ample comprenant, en plus de l'essai de mutation bactérienne et de l'essai chromosomique, des essais de mutation génique dans des cellules de mammifères ou dans des levures et sur les lésions de l'ADN dans des bactéries, des levures ou des cellules de mammifères. Dans certains cas, une telle batterie peut comprendre des essais chromosomiques *in vivo*. L'utilisation d'une telle batterie plus complète peut accroître la confiance accordée à une évaluation des résultats des premiers essais, bien que la supériorité des batteries amples et complexes n'ait pas été définitivement établie.

Les deux approches permettent de détecter avec fiabilité la plupart des mutagènes et des cancérogènes mutagènes. Il convient de souligner, toutefois, que les produits chimiques qui provoquent une réponse positive dans un ou dans tous les essais d'un ensemble ne sont pas tous obligatoirement dangereux pour l'homme et que des résultats négatifs dans des essais *in vitro* ne prouvent pas de façon définitive qu'un composé est dépourvu d'activité chez l'animal vivant, ainsi que chez l'homme.

Dans certains cas, il peut s'avérer nécessaire de procéder à des essais supplémentaires afin de compléter, vérifier ou faciliter l'interprétation des résultats de la première batterie d'essais. Il peut s'agir simplement de la répétition de l'un des premiers essais dans des conditions expérimentales différentes ou, dans certains cas, d'un essai d'une nature complètement différente. Les résultats obtenus en utilisant une première batterie de deux essais comme le test de mutation reverse chez *Salmonella* (471) et l'essai cytogénétique *in vitro* (473) fournissent les informations de base sur la capacité du produit chimique d'induire des mutations géniques et des aberrations chromosomiques. Ces résultats peuvent constituer une base suffisante pour une première évaluation des dangers. Toutefois, lorsqu'un mutagène bactérien ne produit pas de lésion chromosomique dans l'essai sur les cellules de mammifères, il peut être utile de vérifier si l'activité génétique est limitée aux cellules bactériennes, ou si le produit chimique est également actif sur les cellules eucaryotes. Pour répondre à cette question, on peut utiliser des systèmes variés, et en particulier la conversion génique ou la mutation chez la levure (480, 481), la mutation génique (476), l'échange de chromatides sœurs (479) ou la synthèse d'ADN non programmée dans les cellules de mammifères (482), ou la mutation chez la drosophile (477). L'étape suivante de l'évaluation pourra consister à déterminer si un produit

chimique qui s'est révélé génotoxique pour les cellules eucaryotes est aussi actif sur l'animal vivant. On pourra étudier les composés qui provoquent des cassures *in vitro* en examinant les chromosomes des cellules de la moelle osseuse de rongeurs auxquels on aura administré le produit chimique suspect. Il est possible de préciser davantage l'activité *in vivo* de mutagènes bactériens à l'aide du « mouse spot test » (484). Des techniques ont été récemment mises au point pour étudier la réparation de l'ADN (9) et l'échange de chromatides sœurs (10) chez des animaux traités et elles peuvent être utiles dans quelques cas. Dans d'autres cas, il peut être préférable d'étudier les effets d'un composé sur les cellules germinales de mammifères en utilisant soit l'essai de mutation létale dominante (478), soit l'analyse chromosomique de cellules germinales de rongeurs (483). Pour résumer, on procède, en général, à l'évaluation des dangers génotoxiques potentiels en essayant de répondre aux questions suivantes : a) le composé est-il mutagène et, dans l'affirmative, est-il actif dans les cellules de mammifères ? et b) est-il actif *in vivo* sur des cellules somatiques et/ou des cellules germinales ?

## Références

1. Clayson, D.B. (1981) Carcinogens and carcinogen enhancers. ICPEMC Working Paper No 2/3. *Mutation Res.* 86, 217-229.
2. Rinkus, S.J. and M.S. Legator (1979) Chemical characterisation of 465 known or suspected chemical carcinogens and their correlation with mutagenic activity in the *Salmonella typhimurium* system. *Cancer Res.* 39, 3289-3318.
3. De Serres, F.J. and J. Ashby (Eds) (1982) Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens ; Progress in Mutation Research Vol. 1 Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
4. Ashby, J., F.J. de Serres, M. Draper, M. Ishidate, Jr., B. Margolin, B. Matter and M.D. Shelby (Eds) (1985) Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens ; Progress in Mutation Research Vol 5 Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
5. Dean, B.J. (1985) Summary Report on the performance of cytogenetic assays in cultured mammalian cells. In J. Ashby, F.J. de Serres, M. Draper, M. Ishidate, Jr., B. Margolin, B. Matter and M.D. Shelby (Eds), Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens, Progress in Mutation Research Vol. 5 pp 69-83. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
6. Ishidate, M., Jr. (1981) Application of chromosomal aberration tests *in vitro* to the primary screening for chemicals with carcinogenic and/or genetic hazards. In : Short-term tests for carcinogens : *quo vadis ?* Proceedings of a symposium held in Montpellier, France, *Excerpta Medica*, pp. 58-59.

7. Ishidate, M. Jr. and Odashima, S. (1977) Chromosome tests with 134 compounds in Chinese hamster cells *in vitro* : A screening test for chemical carcinogens. *Mutation Res.* 48 337-354.
8. Ashby, J. (1986) The prospects for a simplified and internationally harmonised approach to the detection of possible human carcinogens and mutagens. *Mutagenesis*, 1 (3-16).
9. Cleaver, J.E. (1984) Methods for studying excision repair of eukaryotic DNA damaged by physical and chemical mutagens. In B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel (Eds) *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
10. Perry P.E. and E.J. Thomson (1984) The methodology of sister chromatid exchanges. In B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel (Eds) *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

### Ouvrages recommandés

*Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. (1984) Edited by B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

*Mutagenicity Testing : A Practical Approach*. (1984) Edited by S. Venitt and J.M. Parry. IRL Press, Oxford and Washington DC.

*Principles of Genetic Toxicology*. (1980) By D. Brusick. Plenum Press, New York and London.

*Guidelines for the Testing of Chemicals for Mutagenicity (Report on Health and Social Subjects, No. 24)*. (1981) Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment, Department of Health and Social Security. H.M. Stationary Office, London.

*Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens. Progress in Mutation Research Vol. 1* (1981). Edited by F.J. de Serres and J. Ashby. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

*Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens. Progress on Mutation Research Vol 1* (1981) Edited by J. Ashby, F.J. de Serres, M. Draper, M. Ishidate Jnr., B.H. Margolin, B.E. Matter and M.D. Shelby. Elsevier Science Publishers.

*Report of the UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Part I, Basic test battery ; Minimal criteria ; Professional standards ; Interpretation ; Selection of supplementary assays*. (1983) Edited by B.J. Dean. Published by the United Kingdom Environmental Mutagen Society, University College of Swansea, United Kingdom.

## **Annexe 2**

**Espèces aquatiques recommandées par l'OCDE pour la  
mise au point de nouveaux tests d'écotoxicité\***

*\* Aquatic testing methods for pesticides and industrial  
chemicals. Detailed review paper prepared for the national  
coordinators of the OECD test guidelines  
programme. Mars 1995.*

## Algues et plantes supérieures

METHOD/ END POINT	FRESHWATER	BRACKISH WATER	MARINE WATER
micro algae, growth	<b>Selenastrum capricornutum</b> (green algae), <b>Scenedesmus quadricauda</b> , <b>S. subspicatus</b> , <b>Chlorella vulgaris</b> , <b>Nitzschia palea</b> , <b>Monoraphidium griffithii</b>	-	<b>Skeletonema costatum</b> (diatom), <b>Phaeodactylum tricor- nutum</b> , <b>Thalassiosira pseudo- nana</b> , <b>Isochrysis balbana</b> ,
macro algae, fer- tilization	<b>Microcystis sp.</b>	n.d.	<b>Champia parvula</b> (red algae)
macro algae, reproduction	n.d.	n.d.	<b>Laminaria saccharina</b> (kelp)
vascular plants, growth	<b>Lemna minor</b> , <b>Lemna gibba</b> ,	<b>Zostera marina</b>	<b>Zostera marina</b>

Espèces animales autres que poissons et crustacés

TAX. GROUP	METHOD/- END POINT	FRESH WATER	BRACKISH WATER	MARINE WATER
PELAGIC ENVIRONMENT				
Bacteria	nitrificat.	Activated sludge	n.d.	n.d.
	respiration	Activated sludge	n.d.	n.d.
	growth	<i>Pseudomonas putidae</i>	n.d.	<i>Photobacterium</i> sp. ("Microtox")
Protozoa	growth	<i>Tetrahymena</i> sp	n.d.	<i>Uronema marina</i>
Rotifera	growth	<i>Brachionus</i> sp, <i>B. calyciflorus</i>	n.d.	n.d.
Bivalvia	larvae survival	n.d.	n.d.	<i>Crassostrea</i> sp., <i>Mytilus edulis</i>
Echinoidea	fertilization, acute tox./ embryo dev.	-	n.d.	<i>Strongylocentrotus</i> sp., <i>Lytechinus pictus</i> , <i>Dendraster</i> sp.
Insecta	survival	<i>Baetis rhodani</i> , <i>Cloeon bipunctata</i>	-	-
Amphibia	survival, developm.	"tadpole" short-term	-	-
BENTHIC ENVIRONMENT				
Bacteria	nitrificat.	natural community	n.d.	n.d.
Bacteria	respiration	natural community	n.d.	n.d.
Planaria	growth	n.d.	n.d.	n.d.
Annelida	survival	<i>Tubifex tubifex</i> , <i>Pristina leidy</i>	n.d.	<i>Arenicola marina</i> , <i>Nereis virens</i> , <i>Neanthes arenaceodentata</i>
Bivalvia	shell growth	<i>Unio</i> sp., <i>Anodonta imbecillis</i>	n.d.	<i>Crassostrea virginica</i> (eastern oyster), <i>C. gigas</i> (pacific oyster), <i>Mercenaria mercenaria</i> (hard clam), <i>Mytilus edulis</i> (blue mussel), <i>Abra alba</i>
Echinoidea	survival	-	n.d.	<i>Echinocardium cordatum</i>
Insecta	survival	<i>Chironomus tentans</i> , <i>C. riparus</i> , <i>Hexagenia limbata</i>	-	-
Amphibia	long-term, survival, developm. (- 21d)	"tadpole"	-	-

Exemple de groupes écologiques recommandés pour la mise au point de tests d'écotoxicité en milieu marin

Taxonomic group	Test organism
<b>Warm marine environment</b>	
Algae, macro	Champia parvula Gracilaria tenuistipitata
Arthropoda, Crustacea	Mysidopsis bahia Penaeus aztecus, and other
Echinodermata	Arbacia punctulata Lytechinus variegatus
Aschelminthes	Brachionus plicatilis
Protozoa	Uronema marinum
Fish	Cyprinodon variegatus
<b>Cold marine environment</b>	
Algae, macro	Champia parvula
Kormophyta	Zostera marina
Echinodermata	Strongylocentrotus sp. Dendraster excentricus
Mollusca	Crassostrea sp. Mytilus edulis Mercenaria mercenaria
Protozoa	Uronema marinum