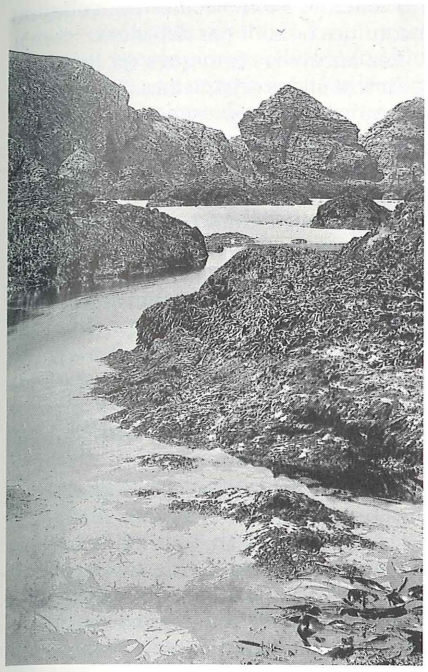

© Roger-Viollet.

Indicateurs biochimiques de contamination de l'environnement marin

M Lafaurie, JF Narbonne**, F Galgani****

L'évaluation du risque écotoxicologique réclame des données sur les relations entre les concentrations des polluants et leurs effets biologiques in situ. La validation in situ d'un biomarqueur permet une évaluation des méthodes de biosurveillance et des tests d'écotoxicité, une estimation du danger lié à un composé chimique et l'établissement de normes de qualité des eaux. Des exercices d'intercalibration sont nécessaires à la qualité et à la reproductibilité des résultats.

Les interactions entre les compartiments biotiques et abiotiques du milieu marin sont nombreuses et soumises aux conditions météorologiques (courants, vents...) qui, par exemple, remettent des sédiments en suspension. Du fait des différentes interfaces et de la grande diversité des voies d'exposition (air, sédiments, eau, chaîne trophique), l'introduction d'un polluant pose d'énormes problèmes de surveillance (détection, identification, quantification) et d'observation des effets selon les molécules (fig 1). La présence de plusieurs polluants dans le milieu, leur métabolisation et la méconnaissance du devenir de leurs métabolites, souvent plus toxiques, compliquent encore la situation.

La pollution par des substances chimiques toxiques, même présentes en de très faibles concentrations (effluents, déchets industriels et domestiques, lessives et détergents, produits phytosanitaires, insecticides, pesticides, herbicides) peut détruire, à long terme, certains maillons de l'écosystème. Si les métaux toxiques sont assez bien connus, les substances organiques toxiques, qui engendrent la synthèse de multiples formes nouvelles, sont très nombreuses (HAP, congénères des PCB, organophosphorés, carbamates...) ; comme les paramètres utilisés pour leur évaluation ne sont pas assez sensibles et représentatifs de ces molécules, leur détermination quantitative est pratiquement impossible en milieu naturel et elles sont nettement sous-estimées. Par ailleurs, les traitements « performants » des stations d'épuration pour certains types de pollutions (MES, MO, microbiologie) rejettent souvent des résidus toxiques complètement ignorés du fait de l'absence d'indicateurs efficaces de dépollution.

Si les polluants dissous subissent, à la longue, une dilution qui permet une limitation dans le temps de leurs effets, le sédiment constitue par contre une forme de persistance plus prolongée dont on ignore en général la capacité de restitution de sa contamination solide ou contenue dans son eau interstitielle. Il est certain que des phénomènes de relargage, erratiques, mais intenses, sont susceptibles de se produire lors de modifications importantes de la qualité des eaux surnageantes (par exemple, la remise en suspension du néphéloïde et de biodépôts par un coup de vent, l'intensification de la bioturbation des sédiments, la persistance de conditions climatiques favorisant la dégradation...). Qu'il s'agisse d'eau ou de matériel particulaire, ces phénomènes d'accumulation se produisent essentiellement dans la partie la moins profonde, mais biologiquement la plus active, du milieu marin. Ils affectent

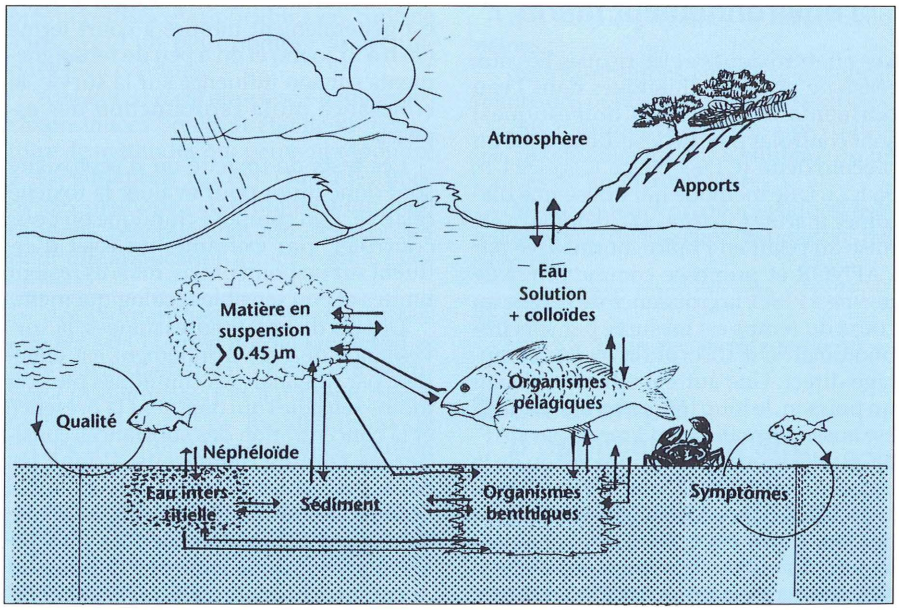

Fig 1. Interactions entre les différents compartiments de l'environnement marin.

*Laboratoire de Biotransformation et Cancérogenèse, Faculté de Médecine, université de Nice-Sophia Antipolis, 06107 Nice Cedex 2. Tel : 93 37 77 21 ; Fax : 93 53 61 21.
**Laboratoire de Toxicologie Alimentaire, université de Bordeaux I, 33405 Talence Cedex. Tel : 56 84 87 20 ; Fax : 56 84 87 19.
***Ifremer, rue de l'Ile d'Yeu, BP 1049, 44037 Nantes Cedex. Tel : 40 37 40 00 ; Fax : 40 27 40 75.

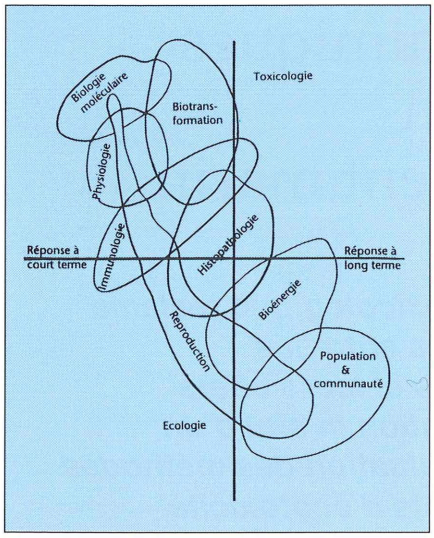

Fig 2. Relations entre les effets des polluants à différents niveaux de l'organisation biologique (29).
– Communautés, populations : les indicateurs écologiques utilisent des indices empiriques (abondance) ou théoriques (diversité). Il n'y a pas d'indication quant à la cause (faible sensibilité), mais la signification écologique à long terme est forte. Les effets observés sont difficilement réversibles.
– Organismes, cellules, molécules : les réponses sont ponctuelles, plus ou moins spécifiques de toxiques particuliers et permettent le diagnostic d'un type de contaminant. Très sensibles, ces effets biologiques ont une faible signification écologique.

intensément les peuplements végétaux et animaux, pélagiques et benthiques qui assurent la fixation, la concentration et le recyclage d'une grande partie des pollutions déversées dans le milieu littoral.

Comment évaluer la santé de l'environnement marin ?

Les effets toxiques et les risques liés aux rejets de produits chimiques dans l'eau (effluents industriels et domestiques) sont contrôlés par des tests de toxicité ou d'écotoxicité (CL_{50}, DL_{50}, CI_{50}... 24 h, 96 h...). Une méthode qui utilise une diatomée marine (*Skeletonema costatum*) a été mise au point en France, normalisée par l'AFNOR et proposée comme projet de norme à l'ISO; la croissance de l'algue au cours du temps est mesurée par spectrophotométrie d'absorption ou par comptage direct. Une autre méthode utilisant un poisson, le loup (*Dicentrarchus labrax*), est aussi normalisée en France par l'AFNOR; elle repose sur l'appréciation de la concentration létale pour 50% des poissons, selon trois procédures qui diffèrent par leur durée (24 h, 96 h) et le renouvellement du milieu. D'autres tests de toxicité des eaux marines et estuariennes sont aujourd'hui proposés en kit. Des larves d'Artemie *(Artemia salina)* et des néonates du rotifère *Brachionus plicatili* font également l'objet de mesures de CL_{50}/24 h et un test sur bactéries est disponible dans le commerce ; il repose sur la mesure de l'émission de lumière par une bactérie photoluminescente en présence de subs- tances toxiques.

On peut émettre certaines réserves sur l'utilisation des tests d'écotoxicité :

– ces tests, souvent empiriques, tiennent rarement compte des mécanismes cellulaires mis en jeu en réponse à l'impact d'une molécule chimique ou d'un effluent ;

– dans la majorité des cas, ces tests concernent les métaux et très rarement les molécules organiques qui se comptent pourtant par dizaines de milliers: De nouvelles molécules sont inventées tous les jours et seules quelques-unes sont relativement connues ;

– les espèces standardisées ne reflètent pas la grande diversité et les différences interspécifiques que l'on trouve en pharmacodynamie ou en toxicocinétique ;

– les doses ou les concentrations utilisées pour tester des molécules toxiques sont toujours beaucoup plus élevées que celles que l'on peut trouver *in situ* et reflètent rarement la réalité d'une contamination ;

– la spéciation chimique mal connue dans l'environnement ne renseigne pas sur les formes biologiquement actives (organométalliques, congénères des PCB...) ;

– les problèmes de transfert et d'accumulation dans les chaînes trophiques ne sont pas pris en compte ;

– les effets de pollutions mixtes, dans des conditions environnementales, ne sont pratiquement jamais envisagés ;

– la cinétique, l'absorption et la biodisponibilité des polluants dans les sédiments en fonction de leur nature (sable, vase, détritus organiques...) sont ignorées car les tests se font généralement en phase aqueuse ;

– le mode d'action du polluant toxique est généralement mesuré à court terme (96 h à 21 jours) et on a peu de renseignements sur son influence sur la survie, la croissance ou la reproduction des espèces.

Les tests de toxicité ou d'écotoxicité sont donc utiles pour évaluer la toxicité relative d'un composé chimique ou pour contrôler, par exemple, un rejet d'effluent sur un point précis, mais ils restent limités et peu sensibles écologiquement.

Depuis de nombreuses années, la surveillance de l'environnement est effectuée par des analyses chimiques plus ou moins sensibles qui détectent la présence et la concentration des substances considérées comme dangereuses dans les eaux douces et marines, les sols, les plantes, les animaux... Le choix d'une stratégie d'échantillonnage, les difficultés analytiques, le coût des campagnes de mesures pluriannuelles et la sensibilité de la méthode de détection sont autant de problèmes auxquels il faut répondre. Par ailleurs, les molécules nouvelles ou inconnues ne sont pas détectées.

Les analyses chimiques de l'eau, du sédiment et des organismes donnent des indications sur la présence ou l'absence d'un polluant et appréhendent le devenir de cette molécule ; seules, elles sont néanmoins insuffisantes et ne renseignent pas sur l'impact réel du polluant. L'estimation et la prédiction des effets d'une molécule sur sa cible finale, c'est-à-dire ses effets biologiques, sont donc difficilement connus.

Pollution chronique diffuse et biosurveillance

La pollution chimique chronique et diffuse (insecticides, détergents, nitrates...) est difficile voire impossible à évaluer avec des méthodes chimiques peu sensibles et des tests d'écotoxicité inadaptés à l'appréciation de la toxicité chronique de ces molécules, compte tenu de leurs faibles concentrations dans le milieu. De plus, les effets de pollutions mixtes, qui sont la règle en milieu naturel, ne sont pas pris en compte.

Conscients de l'évolution notable de ce type de pollution, les décideurs ont demandé aux scientifiques les informations quantitatives nécessaires aux Pouvoirs Publics pour légiférer et agir. La finalité des recherches est donc de combler le grand vide entre la recherche fondamentale en écotoxicologie et les critères de décisions des instances politiques, et de définir de nouveaux outils pour la gestion de l'anthropisation de l'environnement. Ces recherches doivent respecter deux objectifs principaux :

– développer des méthodologies d'identification et de caractérisation de la pollution et des substances dangereuses ;

– veiller à la traduction opérationnelle des résultats et fournir des propositions au plan administratif.

Comparons l'environnement à un être vivant, l'homme par exemple. L'organisme humain peut faire l'objet de contrôles d'apports en substances nocives (alcool, tabac...) ou de bilans, mais ces mesures sont insuffisantes pour une connaissance parfaite et une prédiction de l'état de santé de l'individu. Or, aujourd'hui, l'évaluation de la qualité d'un milieu se fait 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, qui ne concerne que la prévention, 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, grâce à des analyses chimiques ciblées, 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 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 et sur la santé humaine. C'est une véritable « toxicologie de l'environnement » qui se développe aux États-Unis (NOAA, National Marine Fisheries), au Canada (TOXEN), aux Pays-Bas, dans les Pays Scandinaves, avec des programmes officiels de biosurveillance. En France, le RNO commence à utiliser ce type de biomarqueur (EROD).

Les effets biologiques peuvent être utilisés comme indicateurs biologiques ou biomarqueurs de pollution dans les règnes animal et végétal. L'important est que le choix des biomarqueurs permette de lier la toxicité d'un produit chimique à des effets écologiques. Dans l'écosystème, les réponses à chaque niveau donnent des informations pour comprendre et interpréter les relations entre l'exposition et les effets biologiques (fig 2).

Les indicateurs biochimiques de contamination

Les mécanismes fondamentaux de détoxication sont les premiers induits par la présence d'un xénobiotique et, donc, les premiers étudiés avec une grande sensibilité de réponse pour des pollutions chroniques difficilement détectables par l'analyse chimique (fig 3).

L'effet biologique d'un polluant sur sa cible moléculaire est considéré comme un symptôme précoce. Des effets biologiques non spécifiques permettent une évaluation globale de la santé d'un milieu ; des effets plus précis (induction de certaines isoformes du cytochrome P450 par exemple) précisent la nature d'un xénobiotique, que l'analyse chimique fine confirmera (fig 4).

La grande sensibilité de cette méthodologie peut être utilisée pour évaluer la dégradation de certains milieux, mais surtout pour suivre la « santé » de milieux de bonne qualité et intervenir rapidement en cas d'altération mineure.

Les réunions et les ateliers de travail d'experts internationaux du CIO (Commission océanographisque internationale), du PNUE (Programme des nations unies pour l'environnement), du GEEP (Group of Experts on the Effects of Pollutants) et tout récemment de la FAO (Workshop on the Biological Effects of Pollutants on Marine Organisms, Malte, 10–14 septembre 1991) ont souligné l'urgence de solutions aux problèmes de pollutions et le besoin de recherches en toxicologie de l'environnement marin. L'efficacité de techniques en voie de développement ou déjà utilisées pour mesurer les effets biologiques *in situ* des polluants ont été comparées, et on a évalué leur applicabilité dans les études *in situ* de routine. Le choix des espèces tests, des méthodes expérimentales et de biosurveillance applicables en routine s'inspire d'un petit nombre de techniques bien connues.

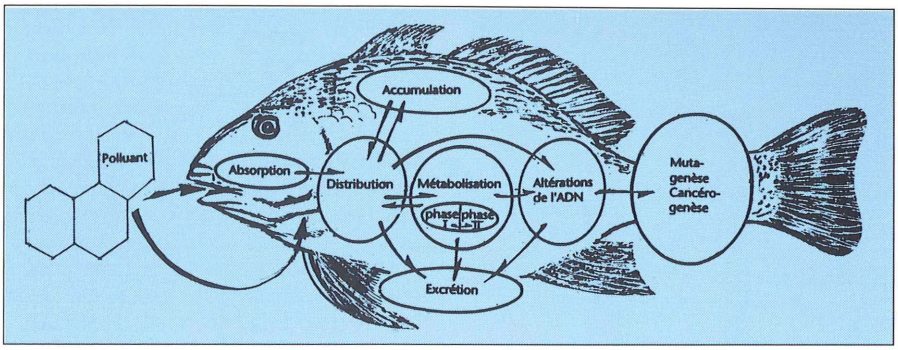

Fig 3. Devenir d'un xénobiotique, ADME (Absorption, Distribution, Métabolisation, Excrétion).

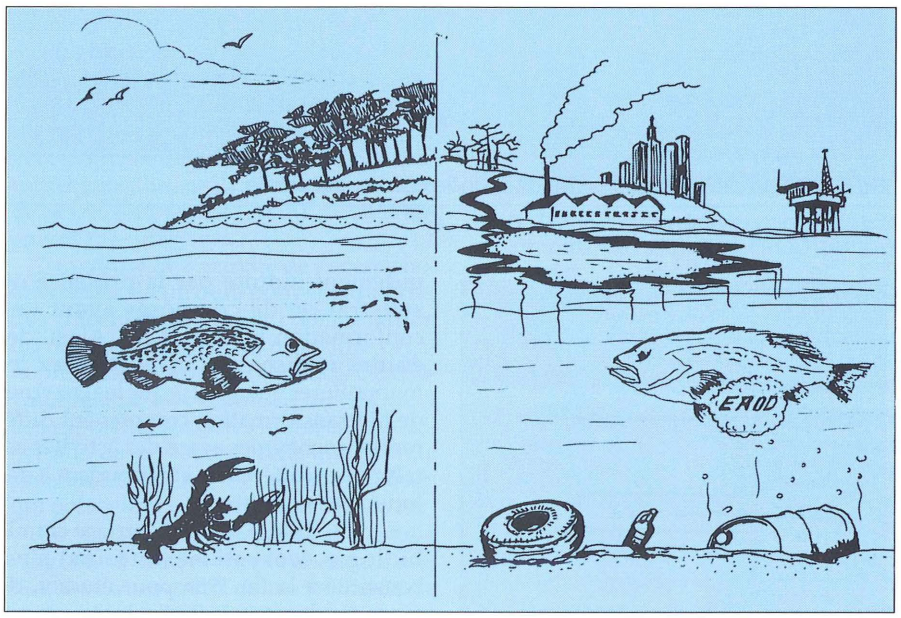

Fig 4. Le xénobiotique induit lui-même le mécanisme destiné à le métaboliser.

Aucun test n'est approprié à toutes les circonstances ; on doit établir un répertoire de méthodes qui peuvent répondre à des situations variées. Quelques-unes de ces méthodes sont aujourd'hui bien connues, généralement admises et prêtes pour une application à court terme. Elles utilisent :

– des biomarqueurs moléculaires tels que les MFO (*mixed function oxidases*) et plus particulièrement l'Ethoxy Résorufine-O-Dééthylase (EROD), l'acétylcholinestérase (AChE) ou les altérations de l'ADN (fixation des métabolites, élution alcaline...) ;

– des anomalies de la fécondation et l'embryotoxicité, en général chez les échinodermes, les mollusques bivalves et les poissons ;

– le bilan énergétique (*scope for growth*), chez les moules et d'autres espèces.

D'autres techniques, dont on envisage le développement pour une utilisation de routine, mesurent :

– des réponses cytogénétiques : induction de micronuclei ou anomalies chromosomiques ;

– des métalloprotéines et métallothionéines ;

– des distributions cellulaire et subcellulaire des polluants, par microanalyses ;

– des marqueurs de stress oxydatifs, tels que le calcium intracellulaire ou les indices de lipopéroxydation ;

– des marqueurs prénéoplasiques, (*early altered foci*) du foie chez les poissons par exemple ;

– la réponse immune aux xénobiotiques ;

– la MXR (*multi xenobiotic resistance*).

Un exemple d'application *in situ* de deux marqueurs biochimiques : l'EROD...

Le concept de base est apparu, il y a une vingtaine d'années, avec la mise en évidence, chez les organismes marins, de systèmes enzymatiques spécialisés dans

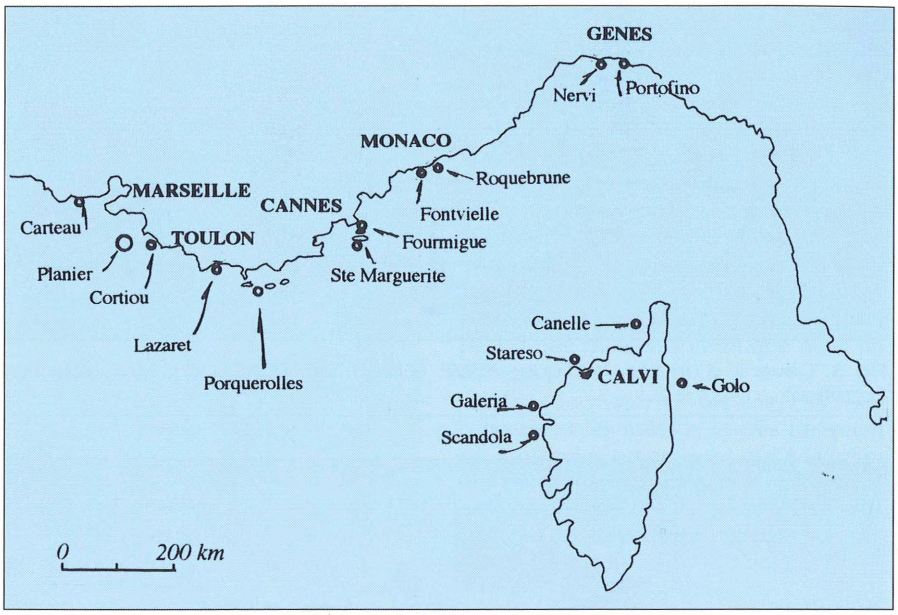

Fig 5. Sites de prélèvement en Méditerranée nord occidentale.

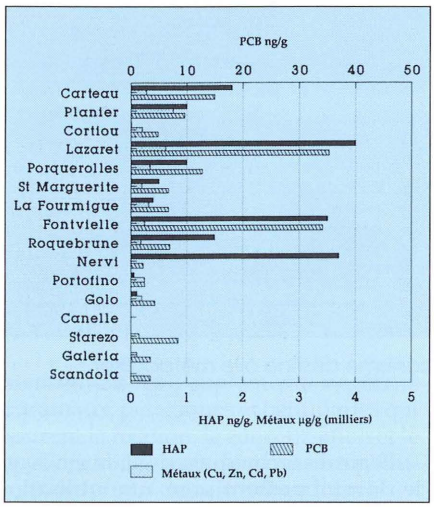

Fig 6. Principaux contaminants des sédiments.

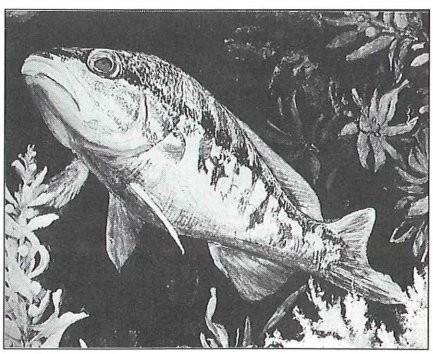

Fig 7. *Serranus cabrilla* (d'après RM Stevenino).

la biotransformation des xénobiotiques liposolubles (oxydation par des monooxygénases dépendantes du cytochrome P450 et conjugaison par des enzymes de phase II). L'activité de ces enzymes est rapidement induite par la présence du substrat ou de composés ayant une conformation voisine [1, 2]. Ainsi, des études réalisées en majorité chez les mammifères ont montré que les enzymes de biotransformation comprenent différentes isoenzymes ayant des activités catalytiques différentes et répondent à des inducteurs spécifiques.

Le GICBEM (Groupe interface chimie biologie écosystèmes marins) s'est constitué à la fin 1986 pour étudier, de façon fondamentale (toxicologie comparée) et appliquée (recherche d'indicateurs permettant une évaluation de la qualité du milieu marin), la réponse des organismes marins à la présence de contaminants. L'objectif est l'étude des corrélations entre, d'une part, le niveau de contamination du milieu, évaluée par l'analyse chimique de divers polluants dans l'eau, les sédiments et certains organismes et, d'autre part, les paramètres biochimiques induits par ces contaminants. Le choix des espèces s'est fait sur les trois critères suivants : large répartition géographique en Méditerranée, sédentarité et représentativité de l'écosystème côtier. Le choix des sites et des contaminants a tenu compte des données du Réseau national d'observation [3] ; 16 sites ont été sélectionnés en Corse et sur les côtes continentales, du golfe de Fos à la Riviera italienne (fig 5). Ils comprennent des stations peu polluées (côtes de Corse), des stations moyennement contaminées (sites continentaux à activités balnéaires ; Cannes, Portofino) et des sites à fortes activités industrielles et portuaires (Fos, Marseille, Toulon, Gênes). Les contaminants les plus importants sont les HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques), les PCB (polychlorobiphényls) et les métaux (fig 6).

De 1987 à 1991, sept missions de prélèvement (été-hiver) ont été effectuées à l'aide des navires océanographiques du Musée de Monaco, du CNRS et de l'Ifremer.

Les serrans (*Serranus cabrilla*) sont les poissons qui ont été retenus à cause de leur sédentarité et de leur hermaphrodisme fonctionnel simultané qui élimine les variations des paramètres biochimiques liées au sexe [4]. Ils sont pêchés à la palangrotte (10 individus par site) et immédiatement sacrifiés. Les foies disséqués sont homogénéisés dans un tampon et stockés dans l'azote liquide (fig 7). Au laboratoire, les homogénats de foie sont décongelés et l'activité éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD) est mesurée, dans la fraction microsomale, par la technique fluorimétrique décrite par Burke & Mayer [5]. Les protéines sont évaluées par la méthode de Lowry *et al* [6].

Les paramètres biochimiques moyens sont exprimés pour chaque site et chaque mission. L'écart type de l'erreur résiduelle (SE) est calculé pour les différents paramètres et évalue la précision de la mesure. La comparaison des moyennes utilise la méthode de la plus petite différence significative (ppds) [7]. On peut ainsi calculer des variations intra-sites saisonnières et annuelles. Pour la variation inter-site, on établit, pour chaque paramètre, une valeur moyenne par site à partir des données obtenues pour l'ensemble des missions. L'amplitude de la réponse d'un paramètre est calculée à partir des valeurs moyennes ainsi obtenues. Le facteur de discrimination intersite est le résultat de la division de la valeur de l'amplitude par la ppds.

Pour les mesures physico-chimiques effectuées dans l'eau, les sédiments et les organismes, une valeur moyenne par site est calculée à partir des données obtenues pour les différentes missions. Les corrélations entre les différents paramètres physicochimiques et les paramètres biochimiques sont calculées comme indiqué par Schwartz [8].

On observe chez les serrans une forte amplitude de réponse des enzymes de biotransformation (de 5 à 8 fois pour l'EROD) et des facteurs de discrimination proches de 3 ; pour ce paramètre, les variations intra-sites sont voisines de 35% (fig 8).

Les taux de cytochrome P450 sont corrélés au contenu des sédiments en HAP. Seule l'activité EROD de *Serranus cabrilla* est corrélée significativement avec la teneur en HAP dans l'eau et les sédiments (fig 9). Dans ce cas, un coefficient de corrélation supérieur est obtenu avec la fraction lourde des HAP. L'induction des oxygénases à fonction mixte est l'un des paramètres les plus étudiés comme indicateur de contamination [9], en particulier dans des études multiparamétriques en milieu naturel telles que :

– le Workshop d'Oslo sur le flet commun (*Platichthys flesus*) collecté en différents sites de Langesund-fjord et présentant un gradient de contamination par les HAP et les PCB [10] ;

– une étude sur la plie du Pacifique (*Pseudopleuronectes americanus*) collectées

en divers points des côtes du Massachussetts [11] ;

– une étude sur la limande-plie rouge *(Platichthys stellatus)* collectés sur plusieurs sites dans la baie de San Francisco [12].

D'après nos résultats, les fortes amplitudes de l'activité EROD se situent dans la gamme des réponses obtenues précédemment (3,05 chez *P americanus*, 4,6 chez *P stellatus* et 14 chez *P flesus*). Une variabilité intrinsèque, relativement limitée, de ce paramètre donne un facteur de discrimination assez élevé voisin de 3 et comparable à celui obtenu chez *P stellatus*. On peut également noter que les variations de l'EROD induites par la saison, de l'ordre de 35% chez *S cabrilla*, sont supérieures à la ppds. Des variations saisonnières de l'activité des MFO, liées aux changements de température et aux phases de la reproduction, ont été mises en évidence chez de nombreuses espèces de poissons en Atlantique et en Méditerranée [4, 13, 14]. Les résultats obtenus en Norvège montraient une bonne corrélation entre les paramètres des MFO (EROD et P450) et le gradient de contamination, en particulier avec les hydrocarbures de haut poids moléculaire [15]. Les données obtenues chez *S cabrilla* confirment ces observations.

La capture des poissons plats, habituellement utilisés en Atlantique ou en Mer du Nord, est beaucoup plus difficile en Méditerranée, et *Serranus cabrilla* apparaît comme une espèce de poisson très intéressante dans cette mer. L'activité EROD est un bon indicateur de la présence de substrats plans avec une forte amplitude de réponse et un bon facteur de discrimination. Les résultats chimiques et biochimiques confirment le faible niveau de pollution des côtes de Corse par comparaison à la Côte d'Azur française et à la Riviera italienne d'une part, et, d'autre part, la forte pollution de certaines zones comme la baie du Lazaret et l'anse de Carteau dans le golfe de Fos. La comparaison des résultats obtenus sur les côtes méditerranéennes au cours de quatre années consécutives avec ceux obtenus sur les côtes de Norvège en 1986 montre que les techniques de surveillance qui mettent en œuvre des indicateurs biochimiques sont fiables et peuvent s'appliquer dans des conditions de milieu différentes. Ceci constitue une étape décisive pour leur validation.

... et l'AChE

Les produits phytosanitaires, issus pour l'essentiel de l'agrochimie (pesticides, composés organophosphorés et carbamates), constituent en milieu marin un problème majeur. La difficulté de surveillance est due à la multiplication des molécules actives (400 actuellement commercialisées en France), mais aussi à la nature instable de ces molécules qui n'exclut pas la haute toxicité de certains métabolites. La désignation de « pesticides biodégradables » est tout à fait relative et, si ces molécules n'ont pas la persistance des organochlorés (DDT, Lindane), des demi-vies de l'ordre de 100 à 200 jours ont néanmoins été mesurées. Les pesticides organophosphorés et les carbamates, bien qu'ils diffèrent dans leurs structures moléculaires, possèdent un même mode d'action : ce sont de puissants inhibiteurs de l'activité acétylcholinestérasique, activité essentielle impliquée dans les mécanismes de transmission de l'influx nerveux. Normalement, l'AChE est responsable de l'hydrolyse de l'acétylcholine, médiateur chimique chargé de la propagation de l'influx nerveux. L'acétylcholine libérée par les synapses est rapidement inactivée par l'AChE, mais l'inhibition de l'enzyme entraîne une accumulation du médiateur qui maintient de ce fait l'excitation. Cette situation entraîne généralement la tétanie, la paralysie, puis la mort. Dès 1915, les militaires se sont intéressés à cette enzyme, utilisée dans les premiers gaz neurotoxiques ; les applications insecticides de ces inhibiteurs de l'AChE ne sont apparues que plus tard.

La mesure de l'activité de l'acétylcholinestérase est un outil pouvant apporter des informations sur la contamination du milieu marin par les pesticides organophosphorés et les carbamates. Des travaux relatifs aux réponses de l'AChE à des expositions courtes montrent que les extraits de poisson offrent une grande sensibilité, à l'opposé des mollusques qui présentent une très faible réactivité.

Ce dosage a été proposé il y a une vingtaine d'années chez le poisson d'eau douce comme outil de surveillance de contaminants [16], et plus tardivement en milieu marin. Récemment, l'importance de la contamination des systèmes côtiers par les pesticides [17] a suscité un nouvel intérêt pour l'activité acétylcholinestérase.

Notre étude a porté sur *Limanda limanda*, dans le German Bight Transect. Cette zone est une radiale située au Nord-Ouest de Bremerhaven, en Mer du Nord, et consiste en une succession linéaire de neuf stations sur une distance de

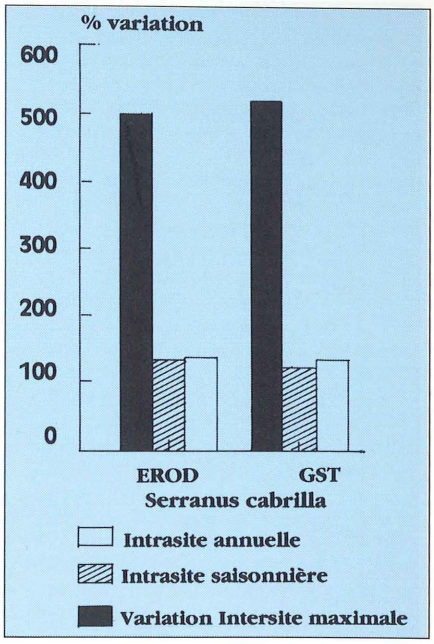

Fig 8. Comparaison des variations intrasite et intersite des activités EROD (éthoxy résorufin O-déethylase) et GST (glutathion-S-transférase) chez *Serranus cabrilla*.

200 milles marins (370 km). La première station se trouve dans l'estuaire de deux fleuves importants, l'Elbe et la Weser, et la neuvième station est située sur le Dogger Bank, large banc de pêche au centre de la Mer du Nord (fig 10).

La limande a été retenue en raison de son abondance dans cette zone et de l'importance du choix d'une espèce type dans le cadre du contrôle des effets des polluants (espèce indigène, au contact du sédiment...).

La méthode de dosage de l'activité AChE est colorimétrique [18] et les protéines totales de l'extrait sont dosées par la méthode de Bradford. L'étude des réponses physiologiques montre que les facteurs sexe et âge n'induisent pas de variations significatives. Par contre, la

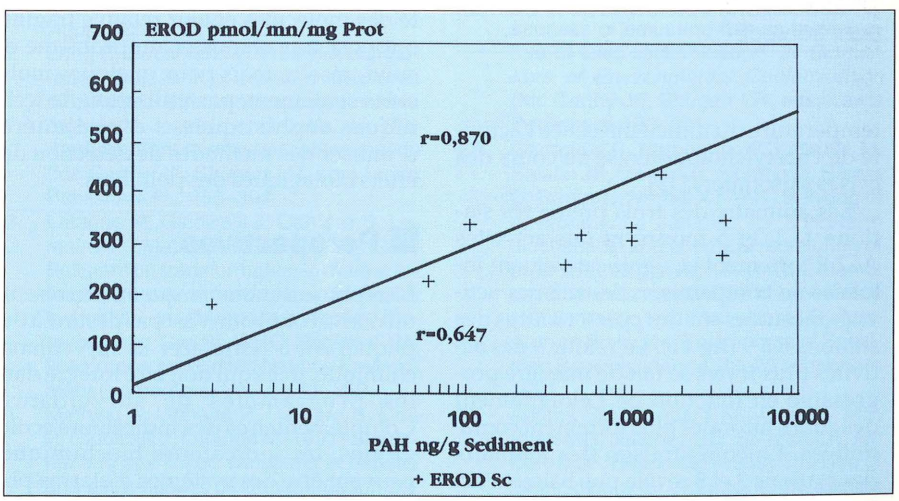

Fig 9. Corrélation entre l'activité EROD et les concentrations en HAP du sédiment chez *Serranus cabrilla*.

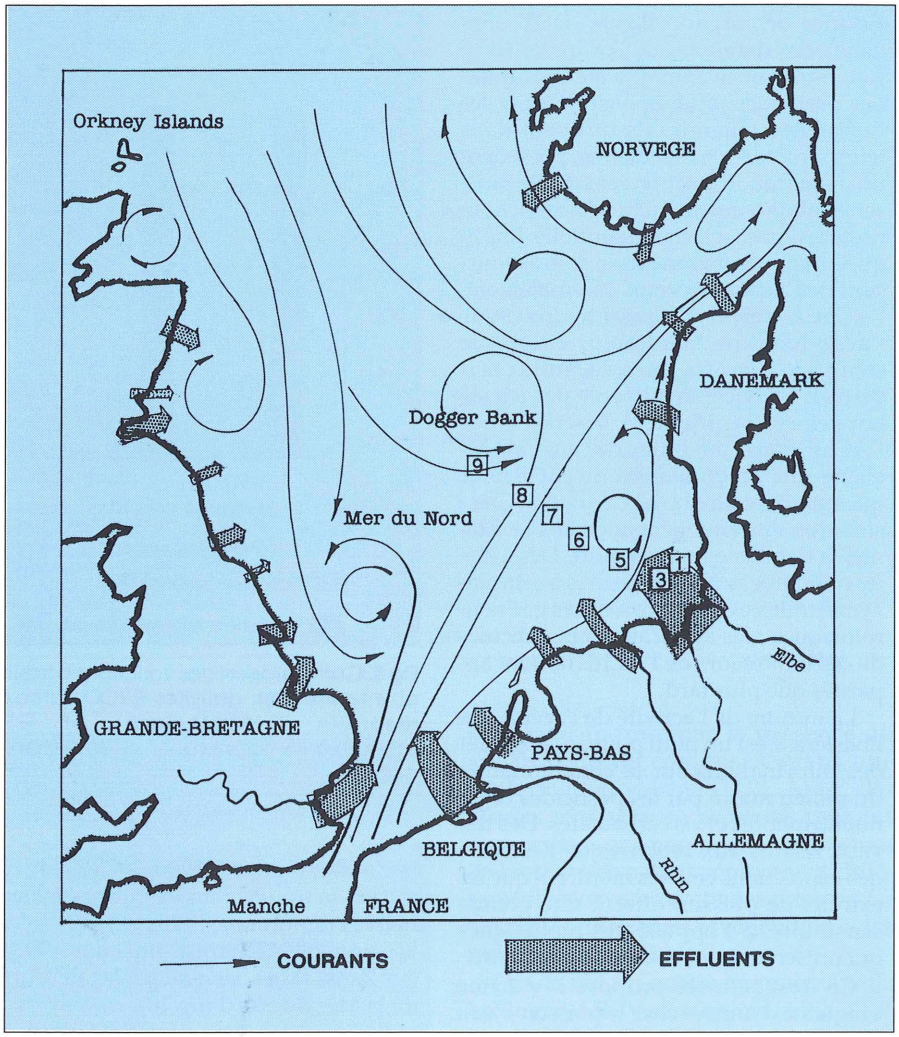

Fig 10. Le German Bight Transect.

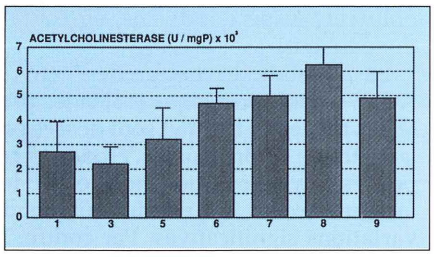

Fig 11. Activités de l'AChE chez *Limanda limanda* prélevées sur le German Bight Transect.

température du milieu influence l'activité de l'acétylcholinestérase au cours des cycles saisonniers [19].

Les animaux des trois premières stations 1, 3, et 5 montrent des activités AChE fortement et significativement inhibées en comparaison des mêmes activités mesurées sur des poissons issus des stations 6 à 9 (fig 11). Le retour à des activités plus fortes se fait de manière progressive en fonction de l'éloignement des zones littorales plus fortement contaminées. La comparaison des animaux des stations 3 et 8 révèle une baisse d'activité supérieure à 60%. Il est intéressant de noter une nouvelle chute de l'AChE chez les animaux pêchés sur la station 9 ; elle correspond à une augmentation des effets inhibiteurs des contaminants. La station 9, qui se trouve sur le Dogger Bank, reflète en effet la forte contamination de cette zone [20], liée à la courantologie générale de la Mer du Nord.

Le RNO (Réseau national d'observation) contrôle régulièrement les pesticides organochlorés (DDT et métabolites, Lindane). Pour les organophosphates et les carbamates, la grande variété des molécules et leur relative fragilité ont posé aux chimistes un problème de suivi, résolu, mais pour quelques molécules seulement, par utilisation de techniques sophistiquées ; d'où l'intérêt d'utiliser des méthodes de détection des effets biologiques des polluants.

Perspectives

La réponse des biomarqueurs représente un nouvel outil qui n'est pas destiné à dupliquer ou à remplacer la surveillance chimique, mais qui doit être intégré dans les programmes de surveillance. Complémentaires des indicateurs écologiques, les indicateurs biochimiques peuvent être des systèmes d'alarme précoces d'une contamination dont les effets peuvent être encore réversibles. Ces effets doivent être confirmés à un niveau supérieur (néoplasmes, anomalies chromosomiques, immunologie) pour avoir un impact populationnel. Par ailleurs, un biomarqueur ne peut être utilisé seul pour détecter ou prédire un risque de contamination ; plusieurs marqueurs complémentaires sont nécessaires pour évaluer l'impact biologique d'un mélange de contaminants, qui constitue la situation la plus fréquemment rencontrée *in situ* [21, 22].

L'utilisation des biomarqueurs dans la surveillance de l'environnement doit respecter trois règles primordiales :

– sélection des biomarqueurs à partir des mécanismes toxicologiques fondamentaux ;

– étude *in situ* de corrélation entre la présence d'un polluant (analyse chimique) et la réponse des marqueurs (dosages biochimiques) ;

– modélisation et confirmation au laboratoire des relations entre polluants, induction de l'activité des mécanismes de détoxication et des effets biologiques nocifs.

La sélection des effets biologiques utilisés comme biomarqueurs doit être validée pour une interprétation significative des réponses. Il faudra en particulier :

– établir des relations qualitatives et quantitatives entre la contamination par le polluant (présence et niveau), la ou les réponses des biomarqueurs et les effets nocifs qui en résultent ;

– définir les degrés de spécificité des effets moléculaires et physiologiques ;

– distinguer les variabilités physiologiques (sexe, cycles, nutrition...) et individuelles des mécanismes de réponses, selon les espèces sentinelles choisies, des variations dues au polluant ;

– valider l'extrapolation de la réponse de biomarqueurs à l'échelle de la population ou de la communauté, obtenue à partir des résultats d'organismes individuels. Le choix des biomarqueurs doit lier la toxicité d'un produit chimique à des effets écologiques ;

– utiliser des biomarqueurs chez l'animal qui permettent une homologation du potentiel d'exposition chez l'homme ;

– tenir compte des mécanismes d'adaptation et de compensation des espèces, et en particulier de l'acquisation de caractères résistants.

Le problème de l'adaptation des organismes aux milieux pollués (écotolérance) implique de nouvelles recherches sur les processus d'acquisition de caractères de résistance (acquisition de gènes de résistance, amplification de certains gènes P450, hormèse...). De nombreux exemples d'organismes qui s'adaptent à des sites très pollués par des mélanges complexes de plusieurs composés chimiques font penser à des mécanismes de protection proche du système MDR (*multi-drug resistance*). L'effet protecteur du système MDR a été étudié dans le cas des cellules tumorales ayant acquis une résistance par un mécanisme membranaire d'extrusion d'un grand nombre d'agents antitumoraux aux effets cytotoxiques [23]. On note qu'un certain

nombre d'inducteurs des cytochromes P450 (sauf le PB) sont aussi des inducteurs des MDR et que ces deux systèmes semblent coordonner leurs réponses de protection contre les xénobiotiques, les MDR évitant une accumulation léthale des xénobiotiques [24]. Récemment, Kurelec [25] a montré que, chez certaines espèces (moules, éponges), un mécanisme similaire existe : le MXR (*multi-xenobiotic resistance*) permet à ces organismes de vivre en milieu très pollué. Cette découverte remet en question toutes les données de bioaccumulation, biodisponibilité, métabolisation, toxicité, relation doses-effets... et permettra peut-être une amélioration des critères de sélection des biomarqueurs. Le MXR est donc un sujet d'études en plein développement et peut être considéré comme un marqueur d'adaptation à un environnement pollué.

Le système immunitaire qui protége des maladies et détruit les corps étrangers est l'un des premiers à être mobilisé et peut donc également servir de marqueur pour un bilan de santé des organismes soumis à des agressions. Weeks *et al* [26] 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 absence d'une méthodologie bien établie appliquée aux mesures *in situ* ; elle représente donc une voie de recherche à développer.

La recherche d'indicateurs biochimiques demande une connaissance approfondie des mécanismes moléculaires de réponse aux divers contaminants chez de nombreux organismes représentatifs des écosystèmes marins. Dans le cas d'une biosurveillance de routine du type RNO, les biomarqueurs sélectionnés sont analysés sur des espèces sauvages et intégrés aux programmes de surveillance chimique ; ils permettent une détection de composés non analysés ou inconnus, présents dans le milieu à des concentrations néfaste à l'environnement marin. L'étude des sites pollués par rapport à des sites de référence écologiquement proches et les analyses statistiques permettent des comparaisons intrasites et intersites saisons/saisons et années/années. Dans les cas de surveillances ponctuelles (observatoires, zones ateliers, émissaires...), les biomarqueurs peuvent être analysés sur des espèces sentinelles, par utilisation, par exemple, de la technique du *caging*; complètent les observations effectuées sur des animaux sauvages, affinent les mesures sur des sites « critiques » ou confirment une hypothèse de contamination.

La mise en place d'observatoires et de zones ateliers, quasi-inexistants à l'heure actuelle, le développement de banques de données physico-chimiques et biologiques en différents points des côtes françaises, européennes et méditerranéennes [27] permettront une intégration des réponses des biomarqueurs, de l'échelle de la molécule à l'échelle de la population. ■

Références

1 Payne JF (1976) Field evaluation of benzopyrene hydroxylase induction as monitor for marine pollution. *Science* 191, 945–946

2 Stegeman JJ (1981) Polynuclear aromatic hydrocarbons and their metabolism in the marine environment. *In: Polynuclear hydrocarbons and cancer* (Gelboin HV, Tso PDP, eds) Vol III, Academic Press, New York, 1–40

3 RNO (1988) Réseau national d'observation de la qualité du milieu marin, Surveillance du milieu marin. Ifremer DERO/EL/RNO/56/MJ, 88, 1–35

4 Mathieu A (1990) Variations des activités de biotransformation chez les poissons marins. Application à la surveillance de l'environnement. Thèse Université de Marseille, Saint Jérôme, France

5 Burke MD, Mayer RT (1974) Ethoxyresorufin: Direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab Disp* 2, 583–588

6 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265–275

7 Legay JM, Chasse JL, Mourgues C, Pontier J, Teulade P (1966) Plans expérimentaux, analyse de la variance. *In: Exercices de statistique pour biologistes* (Legay JM, ed) Flammarion, Paris, 181–183

8 Schwartz D (1963) *In: Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes* (Schwartz D, ed) Flammarion, Paris, 234–237

9 Payne JF, Fancey LL, Rahimtula AD, Porter EL (1987) Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Comp Biochem Physiol* 86C, 233–245

10 Bayne BL, Clarke JS, Gray JS (1988) Biological effects of pollutants: Results of a practical workshop. *Mar Ecol Prog Ser* 46, 1–278

11 Stegeman JJ, Teng FY, Snowberger EA (1987) Induced cytochrome P-450 in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) from coastal Massachusetts evaluated by catalytic assay and monoclonal antibody probes. *Can J Aquat Sci* 44, 1270–1277

12 Long E, Buchman MF (1990) A comparative evaluation of selected measures of biological effects of exposure marine organisms to toxic chemicals. *In: Biomarkers of environmental contamination* (Mc Carthy JF, Shugart LR, eds) Lewis Publishers FL, 355–394

13 Lafaurie M, Giudicelli J, Carrière S, Lemaire P, Mathieu A, Nègre Y (1990) Pollutant biotransformation in marine teleost fish: use in environmental health evaluation. *In: Advances in Applied Biotechnology Series.* WHO Regional Office Europe and United Nations Environment Programme, Vol V, 141–152

14 Mathieu A, Lemaire P, Carrière S, Drai P, Giudicelli J, Lafaurie M (1991) Seasonal and sex-linked variations in hepatic and extra-hepatic biotransformation activities in striped mullet (*Mullus barbatus*). *Ecotox Environ Safety* 22, 45–57

15 Addison RF, Edwards AJ (1988) Hepatic microsomal monooxygenase activity in flounder (*Platichthys flesus*) from polluted sites in Langersundfjord and from mesocosms experimentally dosed with diesel oil and copper. *Mar Ecol Prog Ser* 46, 51–54

16 Coppage DL, Matthews E (1974) Short-term effects of organophosphate insecticides on cholinesterases of estuarine fishes and pink shrimp. *Bull Environ Contam Toxico* Vol II, 438–488

17 Kjolholt J (1985) Occurrence of organophosphorus compounds in polluted marine sediments near a pesticide manufactory plant. *Chemosphere* 14, 1763–1770

18 Ellman GL, Courtney KO, Andres V, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7, 88–95

19 Galgani F, Bocquené G (1990) *In vitro* inhibition of acetylcholinesterase from four marine species by organophosphates and carbamates. *Bull Environ Contam Toxicol* 45, 243–249

20 Dethlefsen V (1988) Status report on aquatic pollution problems in Europe. *Aquatic Toxicology* 11, 259–286

21 Lafaurie M, Mathieu A, Salaün JP, Narbonne JF, Galgani F, Roméo M, Monod JL, Garrigues P (1991) Biochemical markers in pollution assessment: field studies at the north coast of the mediterranean sea. FAO/UNEP/IOC/Workshop on the Biological Effects of Pollutants on Marine Organisms, Malte, 10–14 septembre 1991

22 Narbonne JF, Ribera D, Michel X, Raoux C, Garrigues P, Monod JL, Lemaire P, Galgani F, Roméo M, Salaün JP, Lafaurie M (1991) Indicateurs biochimiques de contamination de l'environnement marin: étude comparative en Mer Méditerranée. *Océanis* Vol 17, 3, 257– 275

23 Moscow JA, Cowan KH (1988) Multidrug resistance. *J Natl Cancer Inst* 80, 14–20

24 Burt RK, Thorgeirsson SS (1988) Coinduction of MDR-1 multidrug-resistance and P450 genes in rat liver by xenobiotics. *J Natl Cancer Inst* 80, 83–86

25 Kurelec B (1991) The multi-xenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. FAO/UNEP/IOC/Workshop on the Biological Effects of Pollutants on Marine Organisms, Malte, 10–14 septembre 1991

26 Weeks BA, Huggett RJ, Warinner JE, Mathews ES (1990) Macrophage responses of estuarine fish as bioindicators of toxic contamination. *In: Biomarkers of Environmental Contamination* (Mc Carthy JF, Shugart LR, eds) Lewis Publishers, 193–201

27 Garrigues P, Narbonne JF, Lafaurie M, Salaün JP, Monod JL, Roméo M, Ribera D, Raoux C, Michel X (1991) Banking of environmental samples for short-term biochemical and chemical monitoring of organic contamination in coastal marine environments: the GICBEM experience (1986–1990). 1rst International Symposium on Biological Environmental Specimen Banking, Vienne, 22–25 septembre 1991

28 Adams SM, Shepard KL, Greeley MS, Ryon MG, Jimenez BD, Shugart LR, Mc Carthy JF, Hinton DE (1989) The Use of Bioindicators for Assessing the Effects of Pollutant Stress in Fish. *Marine Environ Res* 28, 459–464