



NATIONS  
UNIES

EP

UNEP/MED WG.492/4



**PROGRAMME DES NATIONS UNIES POUR  
L'ENVIRONNEMENT  
PLAN D'ACTION POUR LA MEDITERRANEE**

PNUE

7 avril 2021  
Français  
Original : Anglais

Réunion du groupe de correspondance de l'approche écosystémique sur la surveillance de la pollution

Vidéoconférence, 26-28 avril 2021

**Point 3 de l'ordre du jour : Lignes directrices/protocoles de surveillance relatifs à l'indicateur commun 18 de l'IMAP**

**Lignes directrices et protocoles de surveillance pour l'analyse des biomarqueurs des mollusques marins (tels que *Mytilus* sp.) et des poissons (tels que *Mullus barbatus*) pour l'indicateur commun 18 de l'IMAP : analyse de la stabilité de la membrane lysosomale (LMS)**

Pour des raisons environnementales et économiques, ce document est imprimé en nombre limité. Les délégués sont priés d'apporter leurs exemplaires aux réunions et de ne pas demander d'autres exemplaires.

## Note du Secrétariat

Conformément au programme de travail 2020-2021 adopté par la COP21, le programme PNUE/PAM - MED POL a préparé les lignes directrices de surveillance relatives à l'indicateur commun 18 de l'IMAP, ainsi que les lignes directrices de surveillance relatives à l'assurance de la qualité et à la communication des données.

Avec l'ensemble des lignes directrices de surveillance relatives aux indicateurs communs 13, 14, 17 et 20 de l'IMAP examinés lors des réunions intégrées des groupes de correspondance sur l'approche écosystémique (1-3 décembre 2020), ces nouvelles lignes directrices de surveillance forment des manuels cohérents destinés à guider le personnel technique des laboratoires compétents de l'IMAP des parties contractantes pour la mise en œuvre de pratiques de surveillance normalisées et harmonisées liées à un indicateur commun spécifique de l'IMAP (c'est-à-dire la méthode d'échantillonnage, la conservation et le transport des échantillons, la préparation et l'analyse des échantillons, ainsi que l'assurance de la qualité et la communication des données de surveillance). Ces lignes directrices présentent un résumé des meilleures pratiques connues disponibles et utilisées dans la surveillance du milieu marin, en rassemblant des pratiques analytiques globales intégrées afin de garantir la représentativité et l'exactitude des résultats analytiques nécessaires à la production de données de surveillance de qualité assurée.

Les lignes directrices/protocoles de surveillance s'appuient sur les connaissances et les pratiques acquises au cours des 40 années de mise en œuvre de la surveillance du MED POL et sur des publications récentes, mettant en évidence les pratiques actuelles des laboratoires maritimes des parties contractantes ainsi que d'autres expériences pertinentes.

Les lignes directrices de surveillance relatives à l'analyse des biomarqueurs chez les mollusques marins (comme la *Mytilus sp.*) et les poissons (comme le *Mullus barbatus*) pour l'analyse de l'indicateur commun 18 de l'IMAP fournissent les quatre notes techniques suivantes :

- 1) note technique pour l'analyse de la stabilité de la membrane lysosomale (LMS) sur des coupes au cryostat dans la glande digestive de moules et le foie de poissons et l'évaluation *in vivo* dans les hémocytes de mollusques (UNEP/MED WG.492/4), qui inclut les deux protocoles suivants :
  - i) protocole pour la préparation de coupes de tissus, la détermination enzymatique de la stabilité de la membrane lysosomale (LMS) sur des coupes au cryostat dans la glande digestive de moules et le foie de poissons, ainsi que l'évaluation et l'interprétation des résultats ;
  - ii) protocole pour la détermination *in vivo* de la stabilité de la membrane lysosomale (LMS) dans les hémocytes de moules, ainsi que l'évaluation et l'interprétation des résultats ;
- 2) note technique pour l'analyse de la fréquence des micronoyaux (MN) dans les cellules sanguines de poissons et dans les cellules des branchies et les hémocytes de moules (UNEP/MED WG.492/5), qui inclut les deux protocoles suivants :
  - i) protocole pour l'analyse de la fréquence des micronoyaux (MN) dans les cellules sanguines de poissons, ainsi que l'évaluation et l'interprétation des résultats ;
  - ii) protocole pour l'analyse de la fréquence des micronoyaux (MN) dans les cellules des branchies et les hémocytes de moules, ainsi que l'évaluation et l'interprétation des résultats ;
- 3) note technique pour l'analyse de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) dans les branchies de moules et les muscles de poissons (UNEP/MED WG.492/5), qui inclut le protocole pour la préparation d'homogénats de tissus, et pour la détermination enzymatique de l'activité de l'AChE, ainsi que l'évaluation et l'interprétation des résultats ;
- 4) note technique pour l'analyse du temps de survie à l'air (Stress on Stress, SoS) des moules, qui inclut le protocole pour l'évaluation du SoS, et l'interprétation des résultats.

Ces lignes directrices/protocoles de surveillance, y compris ceux relatifs à l'analyse des biomarqueurs chez les mollusques marins (comme la *Mytilus sp.*) et les poissons (comme le *Mullus barbatus*), créent un socle solide pour la mise à jour régulière des pratiques de surveillance en vue de la mise en œuvre efficace de l'IMAP.

Les participants à la réunion du CORMON sur la surveillance de la pollution (avril 2021) devraient aborder ce document et approuver sa soumission pour examen lors de la réunion sur les points centraux du MED POL prévue en mai 2021.

## Table des matières

1	Introduction.....	1
2	Note technique pour l'analyse de la stabilité de la membrane lysosomale (LMS) a) sur des coupes au cryostat dans la glande digestive de moules et le foie de poissons et b) l'évaluation <i>in vivo</i> dans les hémocytes de mollusques.....	2
2.1	Protocole pour la préparation de coupes de tissus, la détermination enzymatique de la stabilité de la membrane lysosomale (LMS) sur des coupes au cryostat dans la glande digestive de moules et le foie de poissons, ainsi que l'évaluation et l'interprétation des résultats.....	4
2.2	Protocole pour la détermination <i>in vivo</i> de la stabilité de la membrane lysosomale (LMS) dans les hémocytes de moules, ainsi que l'évaluation et l'interprétation des résultats.....	8

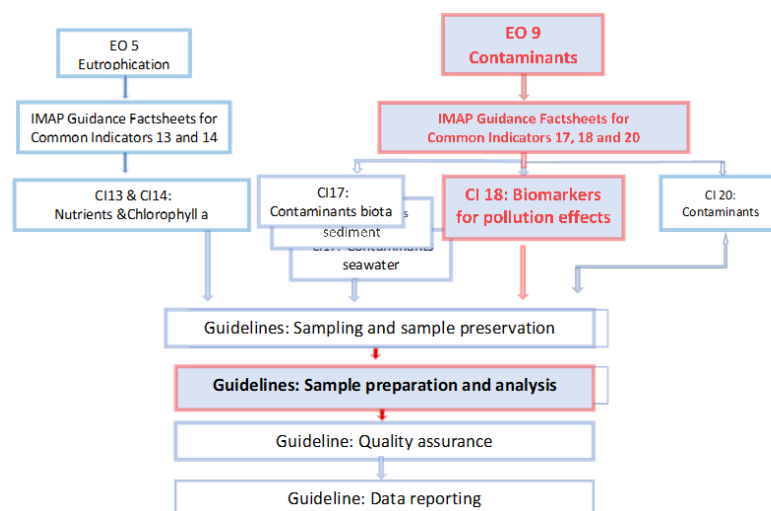
### Annexe I: Références

## List des abréviations / acronymes

<b>ASTM</b>	American Society for Testing and Materials (Société des États-Unis pour les essais et les matériaux)
<b>BDH</b>	British Drug Houses, une grande entreprise chimique qui a fusionné avec Merck KGaA
<b>BODC</b>	British Oceanographic Data Centre (Centre britannique de données océanographiques)
<b>CAS</b>	Le numéro de registre CAS est un identifiant numérique unique attribué par le Chemical Abstracts Service (CAS)
<b>CI</b>	Indicateur commun
<b>COP</b>	Conférence des parties
<b>CORMON</b>	Groupe de correspondance de l'approche écosystémique sur la surveillance
<b>DDW</b>	Eau doublement distillée
<b>EcAp</b>	Approche écosystémique
<b>CE</b>	Commission européenne
<b>AEE</b>	Agence européenne pour l'environnement
<b>EFSA</b>	Autorité européenne de sécurité des aliments
<b>OE</b>	Objectif écologique
<b>APE</b>	Agence de protection de l'environnement des États-Unis
<b>UE</b>	Union européenne
<b>FAO</b>	Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
<b>BEE</b>	Bon état écologique
<b>HELCOM</b>	Commission pour la protection du milieu marin dans la zone de la mer Baltique – Commission d'Helsinki
<b>HPLC</b>	Chromatographie liquide à haute performance
<b>AIEA</b>	Agence internationale de l'énergie atomique
<b>IMAP</b>	Programme de surveillance et d'évaluation intégrées de la mer et des côtes méditerranéennes et critères d'évaluation connexes
<b>ISO</b>	Organisation internationale de normalisation
<b>JGOFS</b>	Étude conjointe des flux océaniques mondiaux
<b>LD</b>	Limite de détection
<b>PAM</b>	Plan d'action pour la Méditerranée
<b>MED POL</b>	Programme coordonné de surveillance continue et de recherche en matière de pollution dans la Méditerranée
<b>MED QSR</b>	Rapport sur l'état de la qualité de la Méditerranée
<b>DCSMM</b>	Directive-cadre stratégie pour le milieu marin
<b>OCDE</b>	Organisation de coopération et de développement économiques
<b>OSPAR</b>	Convention pour la protection du milieu marin de l'Atlantique du Nord-Est
<b>OSW</b>	Eau de mer oligotrophe
<b>QA/QC</b>	Assurance qualité/Contrôle qualité
<b>SI</b>	Système international d'unités [SI, abrégé du Système international (d'unités) français]
<b>SCOR</b>	Comité scientifique de la recherche océanique
<b>SFA</b>	Auto-analyseur à débit segmenté
<b>UNESCO</b>	Organisation des Nations unies pour l'éducation, la science et la culture
<b>WOCE</b>	Expérience mondiale concernant la circulation océanique

## 1 Introduction

1. Un aspect fondamental lié à l'objectif écologique 9 de l'IMAP concerne la surveillance des concentrations de différentes catégories de produits chimiques nocifs mesurées dans les matrices pertinentes, à savoir les sédiments, l'eau de mer et le biote (CI17). Ces données doivent être associées aux résultats concernant le niveau des effets biologiques des contaminants toxiques dans les cas où une relation de cause à effet a été établie (CI18).
2. Il existe différentes approches concernant l'étude des effets biologiques des contaminants généralement classés en fonction du niveau d'organisation biologique. Pour l'indicateur commun 18 de l'IMAP, l'approche optimale est basée sur l'utilisation de biomarqueurs chez certains organismes typiques des eaux côtières marines. Les biomarqueurs sont des paramètres biologiques dont les évolutions peuvent indiquer un syndrome de stress induit par les polluants. L'avantage de l'utilisation de biomarqueurs est que ces paramètres sublétaux sont des indicateurs d'alerte précoce des effets de la contamination chimique. Par conséquent, il est possible de mettre en évidence les premiers effets nocifs des contaminants sur les organismes, avant que les effets au niveau de la population/communauté ne deviennent clairement visibles. L'utilisation de biomarqueurs permet de fournir des informations précieuses aux décideurs afin de mettre en œuvre rapidement les mesures nécessaires pour réduire les dommages au niveau des écosystèmes.
3. Les lignes directrices/protocoles de surveillance relatifs à l'analyse des biomarqueurs chez les mollusques marins (comme la *Mytilus sp.*) et les poissons (comme le *Mullus barbatus*) fournissent des orientations étape par étape concernant les méthodes d'évaluation des biomarqueurs sélectionnés, ainsi que pour l'interprétation des résultats liés à la préparation des échantillons et à l'analyse des biomarqueurs. Ils visent à favoriser des assurances de la qualité des données comparables, ainsi qu'une comparabilité entre les zones d'échantillonnage dans différents programmes de surveillance nationaux.
4. Les lignes directrices/protocoles de surveillance relatifs à l'analyse des biomarqueurs chez les mollusques marins (comme la *Mytilus sp.*) et les poissons (comme le *Mullus barbatus*) suivent le manuel du PNUE/PAM sur l'analyse des biomarqueurs (UNEP/RAMOGÉ, 1999). Ils sont également alignés sur les lignes directrices pour l'analyse des biomarqueurs, qui ont été élaborées par d'autres organisations régionales, telles que l'OSPAR (2013<sup>1</sup>) et le CIEM (Davies et Vethaak, 2012<sup>2</sup>).
5. L'organigramme ci-dessous indique la catégorie des présentes lignes directrices de surveillance relatives à la préparation et à l'analyse des biomarqueurs pour l'indicateur commun 18 de l'IMAP au sein de la structure que forment toutes les lignes directrices de surveillance préparées pour les indicateurs communs 13, 14, 17, 18 et 20 de l'IMAP.



<sup>1</sup> Commission OSPAR, 2013. Background document and technical annexes for biological effects monitoring, Update 2013. p. 239

<sup>2</sup> Davies, I.M.; Vethaak, D. (Ed.) (2012). Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects. ICES Cooperative Research Report, 315. ICES: Copenhagen. ISBN 978-87-7482-120-5. 277 pp. Part of: ICES Cooperative Research Report. ICES: Copenhagen. ISSN 1017-6195.

**Organigramme** : lignes directrices pour la surveillance des objectifs écologiques 5 et 9 de l'IMAP

## **2 Note technique pour l'analyse de la stabilité de la membrane lysosomale (LMS) a) sur des coupes au cryostat dans la glande digestive de moules et le foie de poissons et b) l'évaluation *in vivo* dans les hémocytes de mollusques**

6. Les lysosomes sont des vésicules cytoplasmiques. Ces organites entourés par une seule membrane se caractérisent par le fait qu'ils contiennent plus de 50 types d'hydrolases acides capables de cataboliser la quasi-totalité des différents composants cellulaires. Le pH acide de la matrice lysosomale est maintenu par l'activité d'une pompe à protons présente dans la membrane lysosomale, et par la présence d'un composant interne constitué de protéines acides (Alberts et al., 2002<sup>3</sup>). Le système vacuolaire lysosomal comprend : des lysosomes primaires nouvellement formés (à partir de l'appareil de Golgi) (matrice pH ~ 6) d'une dimension d'environ 0,5 µm dans lesquels les enzymes hydrolytiques ne sont pas actives ; des lysosomes secondaires et actifs (matrice pH 4-5) pouvant atteindre des dimensions de plusieurs µm ; et les lysosomes tertiaires marqués par une taille et une activité hydrolytique réduites, contenant des résidus non dégradables (souvent céroïde-lipofuscine ou lipofuscine) qui peuvent être éliminés par exocytose à partir de cellules qui ont cette capacité.

7. Les lysosomes ont diverses fonctions dans différents types de cellules et différents organismes, mais ils sont toujours associés à la digestion des composants nutritionnels ingérés par les cellules par endocytose ou phagocytose, et à l'activité autophagique (autodigestion) liée au renouvellement des protéines et à la dégradation des composants cellulaires endommagés (Klionsky et Emr, 2000<sup>4</sup> ; Cuervo, 2004<sup>5</sup> ; Moore, 2008<sup>6</sup> ; Moore et al., 2015<sup>7</sup>). Le système vacuolaire lysosomal peut accumuler à la fois des xénobiotiques lipophiles et organiques ainsi que des produits chimiques hydrophiles et inorganiques (Viarengo, 1989<sup>8</sup> ; Moore et al., 2007<sup>9</sup> ; Sforzini et al., 2018a<sup>10</sup>). Il convient de noter que les produits chimiques toxiques qui pénètrent dans les cellules peuvent endommager les membranes, les organites, les protéines solubles, etc. Comme indiqué ci-dessus, les lysosomes sont normalement associés à l'élimination et à la dégradation des composants cellulaires endommagés ; c'est pourquoi les produits chimiques toxiques contribueront à accroître l'activité autophagique. Cette réaction physiopathologique représente un aspect assez classique des effets toxiques des contaminants au niveau cellulaire et peut être mise en évidence par divers paramètres, tels que des modifications du nombre de lysosomes et de leur teneur en enzymes, des changements dans les événements de fusion et l'augmentation conséquente du volume lysosomal, ainsi que des modifications du pH de la matrice et de la perméabilité de la membrane. Ces derniers effets, s'ils sont sévères, peuvent conduire à la libération d'hydrolases acides dans le cytosol, un événement qui pourrait avoir des conséquences extrêmes telles que la mort de la cellule.

8. Parmi les nombreux biomarqueurs développés pour étudier les effets des produits chimiques toxiques sur le système vacuolaire lysosomal, l'évaluation de la stabilité de la membrane lysosomale (LMS) s'est avérée la meilleure solution (Viarengo et al., 2007a<sup>11</sup> ; Moore et al., 2008<sup>12</sup>). Ce biomarqueur est considéré comme présentant une excellente relation dose-réponse, une sensibilité élevée et une spécificité chimique minimale (la plupart des produits chimiques toxiques influent sur la

<sup>3</sup> Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. New York: Garland Science.

<sup>4</sup> Klionsky, D.J., Emr, S.D., 2000. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290, 1717-1721

<sup>5</sup> Cuervo, A.M., 2004. Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol.* 14, 70-77.

<sup>6</sup> Moore, M.N., 2008. Autophagy as a second level protective process in conferring resistance to environmentally-induced oxidative stress. *Autophagy* 4, 254-256

<sup>7</sup> Moore, M.N., Shaw, J.P., Ferrar Adams, D.R., Viarengo, A., 2015. Anti-oxidative cellular protection effect of fasting-induced autophagy as a mechanism for hormesis. *Mar. Environ. Res.* 107, 35-44.

<sup>8</sup> Viarengo, A., 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *Aquat. Sci. Review* 1, 295-317.

<sup>9</sup> Moore, M.N., Viarengo, A., Donkin, P., Hawkins, A.J., 2007. Autophagic and lysosomal reactions to stress in the hepatopancreas of blue mussels. *Aquat. Toxicol.* 84, 80-91.

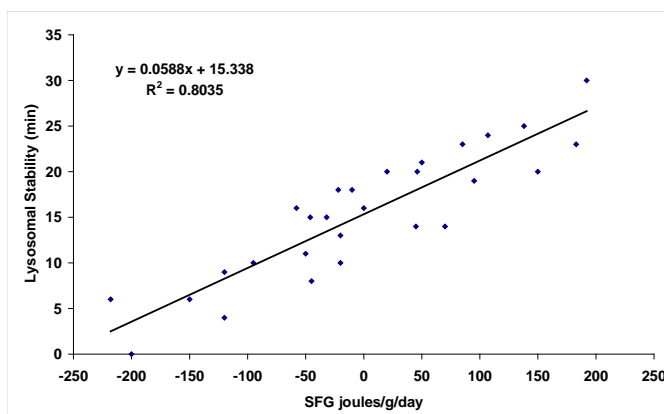
<sup>10</sup> Sforzini, S., Moore, M.N., Oliveri, C., Volta, A., Jha, A., Banni, M., Viarengo, A., 2018a. Role of mTOR in autophagic and lysosomal reactions to environmental stressors in molluscs. *Aquat. Toxicol.* 195, 114-128.

<sup>11</sup> Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A., 2007a. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol. C* 146, 281-300.

<sup>12</sup> Moore, M.N., Koehler, A., Lowe, D. & Viarengo, A., 2008. Lysosomes and autophagy in aquatic animals. In: *Methods in Enzymology* (D. Klionsky, Ed), 451, 582-620. Academic Press/Elsevier, Burlington.

LMS), et il n'existe aucun problème d'ordre méthodologique pour les deux méthodes proposées (temps de rétention du rouge neutre, TRRN, et analyse cytochimique de coupes au cryostat congelées) qui sont très simples et robustes (Moore et al., 2008). Les facteurs de confusion ne représentent généralement pas un problème grave (Svendsen et al., 2004<sup>13</sup>). Cependant, en tenant compte du fait que le système vacuolaire lysosomal est sensible aux variations des paramètres environnementaux (tels que les changements soudains de température et de salinité, la disponibilité alimentaire et l'hypoxie/anoxie – Moore et al., 2008) et aux changements physiologiques liés à la maturation des gonades pendant la période de frai, les connaissances et les précautions adéquates doivent être prises en compte lors de la mise en œuvre d'un programme de biosurveillance (voir « Facteurs de confusion »).

9. Enfin, il est important de souligner que la LMS ne constitue pas seulement un biomarqueur lié au stress reconnu à l'échelle internationale et un diagnostic des altérations physiopathologiques au niveau des tissus cellulaires, mais également le seul biomarqueur cellulaire considéré comme étant un pronostic des effets possibles à l'échelle de la population (Moore et al., 2012<sup>14</sup>). En réalité, Allen et Moore (2004<sup>15</sup>) ont clairement démontré l'existence d'un lien direct entre la LMS et le potentiel de croissance (SFG, Scope for Growth) des moules. Le SFG est un paramètre permettant d'évaluer la capacité des animaux à utiliser adéquatement l'énergie des aliments pour favoriser leur croissance et leur reproduction. Par conséquent, comme l'ont démontré Widdows et al. (1981<sup>16</sup>), une diminution de ce paramètre suppose d'éventuelles évolutions à l'échelle de la population. Les données illustrées à la figure 1 montrent clairement que la réduction de la LMS est associée à une diminution du SFG des organismes ; un annonciateur d'effets possibles à l'échelle de la population.



**Fig. 1.** Stabilité de la membrane lysosomale (LMS) en tant qu'indicateur de la santé de l'ensemble de l'organisme et d'effets possibles à l'échelle de la population. Une relation linéaire significative entre la LMS et le SFG des moules marines *Mytilus edulis* est observée. Les données sont issues de plusieurs expériences sur le terrain et en laboratoire (Allen & Moore, 2004).

10. Récemment, il a été démontré dans des études en laboratoire et sur le terrain que les produits chimiques toxiques qui influent sur la LMS inhibent également l'activité de mTOR (cible mécanique de la rapamycine) (Sforzini et al., 2018a, b). La mTOR est une sérine/thréonine protéine-kinase conservée au cours de l'évolution qui joue un rôle clé dans la croissance et la reproduction des organismes en régulant des processus cellulaires importants tels que la synthèse de l'ARN et des protéines, le métabolisme énergétique, l'organisation du cytosquelette, la perméabilité de la membrane

<sup>13</sup> Svendsen, C., Spurgeon, D.J., Hankard, P.K., Weeks, J.M., 2004. A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? *Ecotoxicol Environ Saf.* 57, 20-29.

<sup>14</sup> Moore, M.N., Viarengo, A., Somerfield, P.J., Sforzini, S., 2012. Linking lysosomal biomarkers and ecotoxicological effects at higher biological levels. In *Ecological Biomarkers: Indicators of Ecotoxicological Effects* (Editors: C. Amiard-Triquet, J.C. Amiard, P.S. Rainbow). Pp. 107-130.

<sup>15</sup> Allen, J.I., Moore, M.N., 2004. Environmental prognostics: is the current use of biomarkers appropriate for environmental risk evaluation. *Mar. Environ. Res.* 58, 227-232.

<sup>16</sup> Widdows, J., Bayne, B., Donkin, P., Livingstone, D., Lowe, D., Moore, M., & Salkeld, P., 1981. Measurement of the responses of mussels to environmental stress and pollution in Sullom Voe: A base-line study. *Proc. R. Soc. Edin. Section B. Biological Sciences* 80, 323-338.



lysosomale, l'endocytose et l'autophagie (Soulard et al., 2009<sup>17</sup> ; Laplante et Sabatini, 2012<sup>18</sup> ; Sforzini et al., 2018a). Pour ces raisons, la déphosphorylation de mTOR (complexe 1 : mTORC1, et complexe 2 : mTORC2) rend les cellules cataboliques, réduisant ainsi le SFG des animaux. Comme l'ont indiqué Sforzini et al. (2018b<sup>19</sup>), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) accumulés dans la glande digestive de moules mises en cage pendant 28 jours dans le port fortement contaminé de Porto Torres (Sardaigne, Italie) induisent une déphosphorylation de mTORC1 associée à une diminution de la LMS et à une augmentation du rapport de volume entre les lysosomes et le cytoplasme (L/C).

11. Les évolutions lysosomales observées lors des expériences sur le terrain et en laboratoire indiquent clairement qu'une activité autophagique accrue n'est pas compensée par la synthèse des protéines et que les cellules des glandes digestives des moules deviennent cataboliques (Sforzini et al., 2018a, b). Chez ces animaux, l'augmentation de la teneur des lysosomes en lipide neutre semble indiquer que la production d'énergie par les mitochondries par oxydation des acides gras est réduite (Sforzini et al., 2018a). Ces résultats confirment et précisent la raison pour laquelle une diminution de la LMS est indicative et prédictive pour un plus grand ensemble de phénomènes liés à l'inhibition de mTOR pouvant conduire à une réduction du SFG des animaux.

12. Pour ces raisons, la LMS, un biomarqueur simple et robuste, a été adoptée en tant que test obligatoire dans le contexte du programme de biosurveillance MED POL.

13. Dans le cadre de cette note technique, les lignes directrices de surveillance relatives à l'analyse des biomarqueurs chez les mollusques marins (comme la *Mytilus sp.*) et des poissons (comme le *Mullus barbatus*) pour l'indicateur commun 18 de l'IMAP fournissent les deux protocoles suivants : i) protocole pour la préparation des coupes de tissus, la détermination enzymatique de la stabilité de la membrane lysosomale (LMS) sur des coupes au cryostat dans la glande digestive de moules et le foie de poissons, ainsi que l'évaluation et l'interprétation des résultats ; et ii) protocole pour la détermination *in vivo* de la stabilité de la membrane lysosomale (LMS) dans les hémocytes de moules, ainsi que l'évaluation et l'interprétation des résultats.

## **2.1 Protocole pour la préparation de coupes de tissus, la détermination enzymatique de la stabilité de la membrane lysosomale (LMS) sur des coupes au cryostat dans la glande digestive de moules et le foie de poissons, ainsi que l'évaluation et l'interprétation des résultats**

### **a. Principe**

14. La procédure cytochimique pour l'évaluation de la LMS est basée sur la détermination de l'activité des enzymes lysosomales N-acétyl- $\beta$ -hexosaminidase. La déstabilisation des lysosomes est évaluée comme une augmentation de la perméabilité de la membrane au substrat enzymatique (naphtol AS-BI N-acétyl- $\beta$ -glucosaminide) observée grâce à la réaction avec les enzymes en présence de sel de diazonium. Les évolutions de la stabilité des membranes lysosomales sont déterminées en exposant des coupes au cryostat à une solution acide : avec ce traitement, les lysosomes d'animaux sains restent non perméables au substrat pendant des périodes plus longues (entre 21 et 40 min), mais la membrane des lysosomes dans les cellules des organismes stressés est labilisée en un temps plus court, en fonction de la gravité du syndrome de stress induit par les polluants.

### **b. Matériel**

15. Le matériel suivant est nécessaire pour permettre une application optimale du protocole : béchers en verre ; éprouvettes graduées en verre ; cuves de coloration de Hellendahl ; pipettes à volume réglable, 20-200  $\mu$ l et 200-1 000  $\mu$ l ; embouts de pipettes, 20-200  $\mu$ l et 200-1 000  $\mu$ l ; lames

<sup>17</sup> Soulard, A., Cohen, A., Hall, M.N., 2009. TOR signaling in invertebrates. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 825-836.

<sup>18</sup> Laplante, M., Sabatini, D.M., 2012. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149, 274-293.

<sup>19</sup> Sforzini, S., Oliveri, C., Orrù, A., Chessa, G., Jha, A., Viarengo, A., Banni, M., 2018b. Application of a new targeted low density microarray and conventional biomarkers to evaluate the health status of marine mussels: A field study in Sardinian coast, Italy. *Sci. Total Environ.* 628-629, 319-328.

porte-objets, 76 x 26 mm, 1 mm d'épaisseur, pré-nettoyées/prêtes à l'emploi, Menzel-Gläser, Superfrost ; lamelles couvre-objets, n° 1 (0,13 - 0,16 mm), 60 x 24 mm, Menzel-Gläser.

c. Équipement

16. Les solutions et produits chimiques suivants sont nécessaires pour permettre une application optimale de ce protocole : cryostat de haute qualité ; bain-marie thermostatique à agitation (jusqu'à 40 °C) ; microscope à fond clair de qualité (objectifs x10, x20, x40) équipé d'une caméra vidéo linéaire en couleurs ; pH-mètre ; agitateur magnétique.

d. Produits chimiques et solutions

17. Les solutions et produits chimiques suivants sont nécessaires pour permettre une application optimale de ce protocole : tampon de labilisation de la membrane lysosomale (solution A) 0,1 M de tampon Na-citrate, 2,5 % de NaCl (p/v), pH 4,5.

18. Le milieu d'incubation du substrat (solution B) doit être préparé uniquement 5 minutes avant utilisation en suivant la procédure suivante : dissoudre 20 mg de naphthol AS-BI N-acétyl-β-D-glucosaminide (Sigma Aldrich, N4006) dans 2,5 ml de 2-méthoxyéthanol et les porter à 50 ml avec la solution A, qui contient également 3,5 g de Polypep (Sigma Aldrich, P5115 ; polypeptide à basse viscosité agissant en tant que stabilisateur de coupes - Le Polypep n'est pas facile à dissoudre. Par conséquent, il doit être laissé à dissoudre dans la solution A quelque temps avant l'ajout du substrat).

19. Préparer le colorant diazonium (solution C) en suivant la procédure suivante : 0,1 m de tampon Na-phosphate, pH 7,4, contenant 1 mg/ml de colorant diazonium Fast Violet B Salt (Sigma Aldrich, F1631) (ou Fast Red Violet LB Salt - Sigma Aldrich, F3381 ; ou Fast Blue RR - Sigma Aldrich, 201545) (remarque : solution saturée, à conserver dans l'obscurité).

20. Milieu de montage aqueux (par ex. glycérol gélatiné) pour fixer les coupes<sup>20</sup>.

e. Préparation des coupes de tissus

21. À l'aide d'un cryostat motorisé de haute qualité (température de l'enceinte inférieure à -28 °C), réaliser des coupes de 10 μm d'épaisseur à l'aide d'un couteau avec un angle de 15°. Transférer les coupes sur des lames « chaudes » (à une température ambiante d'environ 20 °C) pour les sécher rapidement. Les lames peuvent être stockées dans le cryostat pendant au moins 4 heures avant utilisation. Avant l'analyse, les coupes de tissus sont progressivement acclimatées à température ambiante (au moins 30 min à 4 °C et 30 min à température ambiante).

f. Détermination enzymatique de la LMS

22. L'application de la procédure suivante est essentielle selon Moore (1976<sup>21</sup>), UNEP/RAMOGÉ (1999<sup>22</sup>), Moore et al. (2004<sup>23</sup>) et Martínez-Gómez et al. (2015<sup>24</sup>). Placer les lames renfermant les coupes dans une cuve de Hellendahl contenant la solution A pendant des durées différentes (3, 5, 10, 15, 20, 30, 40 minutes) à 37 °C dans un bain-marie à agitation (60 tpm) afin de déterminer l'intervalle de temps de prétraitement nécessaire pour labiliser complètement la membrane lysosomale, c'est-à-dire la période de labilisation (LP). Transférer l'ensemble de lames dans la solution B et les incuber pendant 20 minutes à 37 °C dans une cuve de Hellendahl placée dans un bain-marie à agitation. Laver les lames dans une cuve de Hellendahl remplie d'eau de mer filtrée à température ambiante ou avec une solution saline (3 % de NaCl) à température ambiante pendant 2 à 3 minutes.

<sup>20</sup> Dans le cas de quelques produits chimiques, le fournisseur fournit des indications qu'il est fortement recommandé de suivre à la lettre afin d'obtenir des résultats comparables. Sauf indication contraire, les réactifs doivent être de qualité analytique.

<sup>21</sup> Moore, M.N., 1976. Cytochemical demonstration of latency of lysosomal hydrolases in digestive gland cells of the common mussel *Mytilus edulis*, and changes induced by thermal stress. *Cell Tissue Res.* 175, 279-287.

<sup>22</sup> UNEP/RAMOGÉ (1999). Manual on the Biomarkers Recommended for the UNEP/MAP MED POL Biomonitoring Programme. UNEP, Athens.

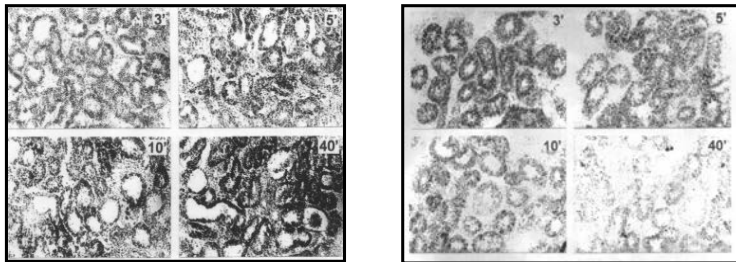
<sup>23</sup> Moore, M.N., Lowe, D. and Köhler, A. 2004. Biological effects of contaminants: Measurement of lysosomal membrane stability. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*. No. 36. 39 pp.

<sup>24</sup> Martínez-Gómez, C., Bignell, J. and Lowe, D., 2015. Lysosomal membrane stability in mussels. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences* No. 56. 41 pp

Ensuite, transférer les lames dans la solution C contenant le coupleur au diazonium pendant 10 min à température ambiante, puis les rincer dans une cuve de Hellendahl remplie d'eau courante du robinet pendant 5 minutes. Enfin, fixer les coupes dans un milieu de montage aqueux.

g. Évaluation des résultats

23. Observer les lames au microscope et diviser l'analyse de chaque coupe en quatre parties (quartiers) pour une interprétation statistique. Les lysosomes se coloreront en rouge pourpre en raison de la réactivité du substrat avec les N-acétyl- $\beta$ -hexosaminidase (Fig. 2).



**Fig. 2.** LMS sur coupe au cryostat de la glande digestive de *Mytilus sp.*, image de gauche : site non pollué, image de droite : site pollué.

24. Réaliser l'évaluation de la LP comme indiqué dans la figure 3. L'intensité de la coloration peut être évaluée visuellement par examen microscopique. Il est également possible de collecter des images microscopiques à l'aide d'une caméra vidéo et de les analyser à l'aide d'un analyseur d'images. Appliquer un temps de prétraitement minimal de trois minutes car les coupes sans prétraitement peuvent présenter une coloration parfois plus forte.

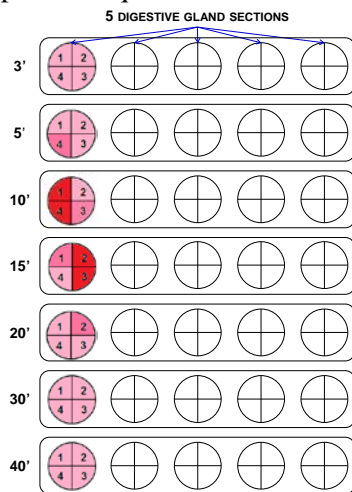
25. Enfin, comparer la LP des échantillons tests à celles obtenues à partir des moules échantillonnées dans la zone de référence et déterminer le gradient de cytotoxicité. Une réduction de la LP selon le gradient de pollution prévu indiquerait un stress cellulaire dû à la pollution. Toute diminution de l'intensité de la coloration dans des coupes successives suivant celles présentant la coloration maximale peut être due à une perte d'enzymes par diffusion à partir de lysosomes complètement labilisés. Si la coloration présente deux pics d'intensité, considérer uniquement le premier pic de coloration comme étant celui de la LP. Ce phénomène peut être dû aux différentes propriétés des lysosomes présents dans les cellules.

26. Pour la glande digestive de moules et le foie de poissons, des intervalles de temps de 3, 5, 10, 15, 20, 30 et 40 minutes sont normalement utilisés (Moore, 1976, Köhler<sup>25</sup>, 1991 ; Köhler et Pluta, 1995<sup>26</sup>). Les données peuvent ensuite faire l'objet d'une analyse statistique à l'aide du test U non

<sup>25</sup> Köhler, A., 1991. Lysosomal perturbations in fish liver as indicators for toxic effects of environmental pollution. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C, 123-127.

<sup>26</sup> Köhler, A. Pluta, H.J., 1995. Lysosomal injury and MFO activity in the liver of flounder (*Platichthys flesus* L.) in relation to histopathology of hepatic degeneration and carcinogenesis. *Mar. Environ. Res.* 39, 255-260.

paramétrique de Mann-Whitney (Speigel, 1961<sup>27</sup>) et être comparées aux données de référence.



**Fig. 3.** Évaluation de la LP : pour chaque coupe, analyser un quartier et déterminer la durée d’incubation dans le tampon acide produisant l’intensité de coloration maximale. Répéter l’analyse pour les trois quartiers restants et établir une moyenne des données. Cette valeur représente la LP de la première coupe de glande digestive. Les LP pour les autres animaux (dans le cas présent, n = 5) sont obtenues de manière similaire. Exemple : intensité de coloration maximale (rouge) : quartier 1 = 10 min ; quartier 2 = 15 min ; quartier 3 = 15 min ; quartier 4 = 10 min ; valeur de la LP pour l’échantillon 1 = moyenne des 4 quartiers = 12,5 min

27. Il est important de noter qu’en utilisant des coupes de tissus au cryostat non pré-incubées dans la solution acide, il est possible, par analyse d’images, d’obtenir des données concernant le rapport entre les volumes de lysosomes et de cytoplasme. Ce paramètre pourrait être associé à celui de la LMS pour déterminer si les organismes sont « cataboliques » : c’est-à-dire lorsque le renforcement du processus autophagique dans les cellules n’est plus compensé par un niveau adéquat de synthèse de protéines (Sforzini et al., 2018a, b).

28. À la fin de l’analyse, les résultats de l’évaluation de la LMS doivent être répertoriés sur une page supplémentaire du registre d’analyse des biomarqueurs (en indiquant également les données liées à l’analyse et le nom des chercheurs concernés). Si les lames ont été analysées à l’aide d’une caméra vidéo, l’emplacement exact du fichier relatif à l’analyse des biomarqueurs doit être ajouté dans le registre d’analyse des biomarqueurs, avec des informations concernant le congélateur à -80 °C dans lequel les platines sont stockées après l’analyse.

#### h. Interprétation des résultats

29. L’analyse des données tirées des études confirme que les évaluations des concentrations de référence (Background Assessment Concentration, BAC) et les critères d’évaluation environnementale (Environmental Assessment Criteria, EAC) pour la LMS chez les moules sont principalement ceux présentés dans la décision IG23/6<sup>28</sup> relative au rapport sur l’état de la qualité de la Méditerranée 2017 et dans le rapport de Davies et Vethaak, 2012.

- i) LMS évaluée selon la méthode histochimique : BAC = 20 min, EAC = 10 min.
- ii) Les valeurs LMS supérieures à 20 min doivent être considérées comme étant typiques des moules vivant dans des conditions saines.
- iii) Les valeurs LMS entre 20 à 10 min concernent les animaux présentant un état de stress et les moules concernées par des valeurs LMS inférieures à 10 min doivent être considérées comme souffrant d’un stress pathologique.
- iv) Concernant la LMS dans le foie de poissons (*M. barbatus*), il n’existe pas encore suffisamment de données pour quantifier adéquatement les valeurs BAC et EAC :

<sup>27</sup> Speigel, M.R., 1961. Statistics. Schaum’s Outline Series. Mc Graw-Hill Book Company, 359 p.

<sup>28</sup> Décision IG23/6 relative au rapport sur l’état de la qualité de la Méditerranée 2017.

dans ce cas, les valeurs LMS obtenues chez les poissons des sites d'échantillonnage contrôlés doivent toujours être comparées à celles obtenues chez les poissons vivant dans des zones de contrôle relativement vierges.

i. Facteurs de confusion

30. Chez les moules, les valeurs extrêmes des paramètres environnementaux peuvent influencer sur la LMS. C'est pourquoi les animaux ne doivent pas être échantillonnés en hiver (basse température et privation de nourriture) ni en période estivale lorsque la température de l'eau de mer est trop élevée (la température du site d'échantillonnage doit toujours être enregistrée), et les animaux doivent toujours être échantillonnés à environ 4 m de profondeur pour éviter de prélever des animaux souffrant de longues périodes d'hypoxie (Moore et al.<sup>29</sup>, 1980, 2007 ; CIEM, 2011<sup>30</sup> ; Commission OSPAR, 2013).

31. En outre, il est important de savoir que de faibles salinités peuvent influencer sur la réponse des biomarqueurs : un fait qui peut devenir pertinent pour les programmes de biosurveillance utilisant des moules en cage dans des zones telles que les estuaires. De plus, les moules présentent des conditions physiologiques différentes au cours des différentes saisons. C'est pourquoi les animaux doivent toujours être échantillonnés en dehors des périodes de ponte. En effet, pendant ces périodes, les animaux sont souvent en mauvais état et affichent des valeurs LMS réduites. Cependant, chez les poissons (*Mullus barbatus*), le frai n'a que des effets minimes sur l'activité lysosomale et ne masque pas les effets que les produits chimiques toxiques peuvent avoir sur la LMS (Köhler, 1991).

j. Communication des données

32. Comme indiqué dans la fiche d'information et d'orientation relative au CI18 de l'IMAP, l'unité approuvée pour la stabilité de la membrane lysosomale (LMS) chez les mollusques bivalves tels que les moules ou les poissons (*M. barbatus*) est la « minute » (méthode enzymatique sur les coupes au cryostat).

## **2.2 Protocole pour la détermination *in vivo* de la stabilité de la membrane lysosomale (LMS) dans les hémocytes de moules, ainsi que l'évaluation et l'interprétation des résultats**

33. Le rouge neutre (NR) est une eurhodine capable de pénétrer librement la membrane cellulaire sous sa forme lipophile. Dans les cellules, le composé est piégé par protonation sous sa forme hydrophile dans les lysosomes et accumulé dans les organites, où il peut être observé au moyen d'une microscopie sur fond clair révélant une couleur rouge ou d'une microscopie de fluorescence à l'aide d'un filtre d'émission de la rhodamine. La quantité de rouge neutre piégé dans les lysosomes dépend du pH des organites, en partie en raison de l'efficacité de la pompe à protons associée à leur membrane (Seglen, 1983<sup>31</sup>). Le test du temps de rétention du rouge neutre (TRRN) reflète l'écoulement du colorant des lysosomes vers le cytosol à la suite des dommages causés à

la membrane et/ou de la dégradation de la pompe à ions H<sup>+</sup> (Lowe et al., 1992<sup>32</sup>). Ces altérations de la membrane lysosomale se traduiront par une diminution de la rétention de colorant dans les organites. Des études indiquent que, tout comme la méthode cytochimique décrite ci-dessus, le test du TRRN est sensible aux principales catégories de polluants chimiques (Lowe, 1988<sup>33</sup> ; Moore et al., 2008).

34. Le protocole suivant a été spécifiquement adapté pour être appliqué aux moules, mais il peut être appliqué aux cellules d'autres mollusques.

<sup>29</sup> Moore, M.N., Koehn, R.K., Bayne, B.L., 1980. Leucine aminopeptidase (aminopeptidase-1), N-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase and lysosomes in the mussel *Mytilus edulis* L., in response to salinity changes. *J. Exp. Zool.* 214, 239-249.

<sup>30</sup> ICES. 2011. Report of the Study Group on Integrated Monitoring of Contaminants and Biological Effects (SGIMC), 14–18 March 2011, Copenhagen, Denmark. ICES CM 2011/ACOM:30. 265 pp.

<sup>31</sup> Seglen. P.o. 1983. Inhibitors of Lysosomal functions. *Meth. Enzymol.* 96, 737-765.

<sup>32</sup> Lowe, D., Moore M.N., Evans B.M., 1992. Contaminant impact on interactions of molecular probes with lysosomes in living hepatocytes from dab *Limanda limanda*. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 91, 135-140.

<sup>33</sup> Lowe, D.M., 1988. Alteration in the cellular structure of *Mytilus edulis* resulting from exposure to environmental contaminants under field and experimental conditions. *Mar. Ecol., Prog. Ser.* 46, 91-100.

a. Matériel

35. Le matériel suivant est nécessaire pour permettre une application optimale du protocole : pipettes à volume réglable, 20-200 µl et 200-1000 µl ; embouts de pipettes, 20-200 µl et 200-1000 µl ; tubes de microcentrifugeuse, bouchons à pression, 2,0 ml ; bécher en verre de 2 l ; lames porte-objets, 76 x 26 mm, 1 mm d'épaisseur, pré-nettoyées/prêtes à l'emploi, Menzel-Gläser, Superfrost ; lamelles couvre-objets, n° 1 (0,13 - 0,16 mm), 60 x 24 mm, Menzel-Gläser.

b. Équipement

36. L'équipement suivant est nécessaire : microscope à fond clair de qualité (éventuellement un microscope inversé) avec objectifs x10, x20 et x40 équipé d'une caméra vidéo linéaire en couleurs ; chambres d'humidité (le RN est un colorant photosensible, les chambres d'humidité doivent donc être recouvertes d'une feuille d'aluminium pour empêcher l'entrée de la lumière) ; pompe à air d'aquarium et barboteur ; pH-mètre ; agitateur magnétique.

c. Produits chimiques et solutions

37. L'utilisation d'eau de mer filtrée (0,45 µm) recueillie sur les sites d'échantillonnage des animaux est recommandée. Autrement, il est possible d'utiliser une solution saline physiologique avec une salinité et un pH identique à ceux des sites d'échantillonnage. La salinité de la solution décrite ci-dessous s'élève à d'environ 30,5 PSU (g/Kg). Cependant, en mer Méditerranée, la salinité peut atteindre 44 PSU (g/Kg).

38. La solution saline physiologique doit être préparée comme suit : 20 mM (4,77 g) HEPES ; 436 mM (25,48 g) NaCl ; 53 mM (13,06 g) MgSO<sub>4</sub> ; 10 mM (0,75 g) KCl ; 10 mM (1,47 g) CaCl<sub>2</sub>. La concentration de NaCl doit être ajustée pour tenir compte de la salinité de l'eau de mer du site d'échantillonnage.

39. Dissoudre ces composants dans 1 litre d'eau désionisée. Faire barboter la solution pendant 10 minutes puis ajuster le pH à 7,9 (ou au pH de l'eau de mer) avec 1 M de NaOH. Conserver la solution au réfrigérateur, mais l'utiliser à température ambiante.

40. Le colorant rouge neutre (RN) doit être préparé comme suit : préparer la solution mère en dissolvant 20 mg de poudre de RN (Sigma Aldrich, N4638) dans 1 ml de diméthylsulfoxyde (DMSO). Transférer 5 µl de solution mère dans 995 µl de solution saline physiologique (solution de travail). Conserver la solution mère de RN dans l'obscurité et au réfrigérateur (0-4 °C) lorsqu'elle n'est pas utilisée ; la solution mère peut être utilisée pendant un mois. La solution de travail doit être préparée extemporanément avant l'analyse. N.B. Dans le cas de quelques produits chimiques, le fournisseur fournit des indications qu'il est fortement recommandé de suivre à la lettre afin d'obtenir des résultats comparables. Sauf indication contraire, les réactifs doivent être de qualité analytique.

d. Évaluation pratique

41. La méthode du rouge neutre (RN) est recommandée par Lowe et al. (1995<sup>34</sup>). La méthode de collecte de l'hémolymphe de moules est décrite dans le protocole relatif à la dissection et au stockage d'échantillons de tissus de mollusques marins (comme la *Mytilus sp.*) de la note technique sur la collecte, le transport et l'échantillonnage de mollusques marins (comme la *Mytilus sp.*) pour l'analyse des biomarqueurs.

42. La méthode du RN requiert l'application de la procédure suivante : placer 2 µl de solution de Poly-L-lysine [0,1 % (p/v) dans de l'H<sub>2</sub>O] (Sigma Aldrich, P8920) sur une lame porte-objet et l'étaler avec une lamelle couvre-objet. Laisser sécher dans une chambre d'humidité. Verser 40 µl de mélange de solution saline-hémolymphe sur la lame, là où la Poly-L-lysine a été ajoutée, et incuber dans une chambre d'humidité pendant 30 minutes pour permettre aux cellules de se fixer. Enlever avec

<sup>34</sup> Lowe, D.M., Soverchia C., Moore M.N., 1995. Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. *Aquatic Toxicol.* 33, 105-112.

précaution l'excès de solution de la lame en la plaçant sur le côté et en laissant le liquide s'écouler. Ajouter 40 µl de la solution de travail de rouge neutre et placer la lame dans une chambre d'humidité pendant 15 minutes (maintenue à 15-16 °C pendant l'analyse). Mettre une lamelle couvre-objet et observer la préparation au microscope.

e. Évaluation des résultats

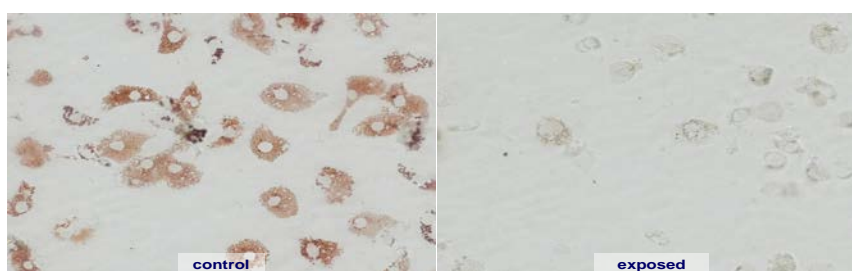
43. Pour évaluer les résultats, il est nécessaire d'observer les lames toutes les 15 minutes pendant la première heure, puis toutes les 30 minutes pendant les deux heures suivantes (le RN est un colorant photosensible. Par conséquent, le temps d'exposition à la lumière pendant l'analyse de l'échantillon doit être aussi court que possible) (UNEP/RAMOGE, 1999 ; Moore et al., 2004). Voir figure 4.

44. Ensuite, déterminer au bout de combien de temps 50 % des lysosomes dans les cellules libèrent du rouge neutre. Déduire une valeur moyenne pour chaque échantillon, puis une moyenne globale pour tous les échantillons appartenant au même lot. Comparer les échantillons provenant de sites surveillés sur le terrain à ceux provenant de sites de référence sur le terrain et déterminer le gradient de cytotoxicité. Une augmentation des taux de libération indiquera un stress cellulaire dû à la pollution.

45. **Tableau 1** : Exemple d'évaluation des résultats : + : plus de 50 % des cellules retiennent le rouge neutre dans les lysosomes ; - : moins de 50 % des cellules retiennent le rouge neutre dans les lysosomes.

Samples	0'	15'	30'	45'	60'	90'	120'
control	+	+	+	+	+	+	+
treated	+	+	±	-	-	-	-

46. Il est également possible de recueillir des images numériques des hémocytes (objectifs x20 ou x40) : cela permettra d'évaluer le TRRN à un stade ultérieur, ce qui peut être important lorsque de nombreux échantillons doivent être analysés. Cette approche permet également d'évaluer la diminution du RN accumulé dans les lysosomes. En outre, les images des cellules et les données recueillies pourraient être envoyées à un laboratoire externe (le centre de référence) pour vérifier la qualité des résultats.



**Fig. 4** : images du test du temps de rétention du rouge neutre (TRRN) illustrant la stabilité de la membrane lysosomale des hémocytes de moules

47. À la fin de l'analyse, les résultats de l'évaluation de la LMS doivent être répertoriés sur une page supplémentaire du registre d'analyse des biomarqueurs (en indiquant également les données liées à l'analyse et le nom des chercheurs concernés). Si la lame a été analysée à l'aide d'une caméra vidéo, l'emplacement exact du fichier relatif à l'analyse des biomarqueurs doit être indiqué dans le registre d'analyse des biomarqueurs.

48. Récemment, Martínez-Gómez et al. (2015) ont suggéré que les altérations de la taille des lysosomes devraient être associées au TRRN pour calculer le pourcentage de LMS. Cette indication prend en considération les évolutions lysosomales telles que les élargissements sans fuite, les fuites et élargissements avec des lysosomes incolores et les cellules arrondies touchées par une fragmentation

(Martínez-Gómez et al., 2015). Bien que nous disposions pour l'instant de données limitées issues des études de biosurveillance sur le terrain, l'analyse des images d'échantillons concernés par le TRRN permettra de recueillir des images de microscopie qui pourraient être utilisées à l'avenir pour améliorer cette analyse.

49. Les données peuvent ensuite faire l'objet d'une analyse statistique à l'aide du test U non paramétrique de Mann-Whitney (Speigel, 1961) et être comparées aux données de référence.

f. Interprétation des résultats

50. L'analyse des données tirées des études confirme que critères d'évaluation de base (BAC) et les critères d'évaluation environnementale (EAC) pour la LMS chez les moules sont principalement ceux présentés précédemment (Davies et Vethaak, 2012) et inclus dans la décision IG23/6 relative au rapport sur l'état de la qualité de la Méditerranée 2017 (MED QSR 2017), respectivement. LMS évaluées selon la méthode du TRRN *in vivo* : BAC = 120 min, EAC = 50 min.

g. Facteurs de confusion

51. Chez les moules, les valeurs extrêmes des paramètres environnementaux peuvent influencer sur la LMS. C'est pourquoi les animaux ne doivent pas être échantillonnés en hiver (basse température et privation de nourriture) ni en période estivale lorsque la température de l'eau de mer est trop élevée ; la température du site d'échantillonnage doit toujours être enregistrée. Les animaux doivent toujours être échantillonnés à environ 4 m de profondeur pour éviter de prélever des animaux souffrant de longues périodes d'hypoxie (Moore et al., 1980, 2007 ; CIEM, 2011 ; Commission OSPAR, 2013).

52. En outre, il est important de savoir que de faibles salinités peuvent influencer sur la réponse des biomarqueurs. C'est un fait qui pourrait devenir pertinent pour les programmes de biosurveillance utilisant des moules en cage dans des zones comme les estuaires. De plus, les moules présentent des conditions physiologiques différentes au cours des différentes saisons. C'est pourquoi les animaux doivent toujours être échantillonnés en dehors des périodes de ponte. En effet, pendant ces périodes, les animaux sont souvent en mauvais état et affichent des valeurs LMS réduites.

h. Communication des données

53. L'unité utilisée pour le test toxicologique approuvé du TRRN dans le cadre du CI18 de l'IMAP pour les mollusques bivalves tels que les moules est la « minute ».



**Annexe I**  
**Références**

## Références

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. New York: Garland Science.
- Allen, J.I., Moore, M.N., 2004. Environmental prognostics: is the current use of biomarkers appropriate for environmental risk evaluation. *Mar. Environ. Res.* 58, 227-232.
- CAS-Chemical Abstracts Service, 2020. Specialized substance collections count: CHEMLIST®. Chemical Abstracts Service. American Chemical Society. (Available at <https://www.cas.org/support/documentation/regulated-chemicals>, accessed 31 August 2020).
- Cuervo, A.M., 2004. Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol.* 14, 70-77.
- Davies, I.M.; Vethaak, D. (Ed.) (2012). *Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects*. ICES Cooperative Research Report, 315. ICES: Copenhagen. ISBN 978-87-7482-120-5. 277 pp. Part of: ICES Cooperative Research Report. ICES: Copenhagen. ISSN 1017-6195.
- Decision IG.23/6 2017 Mediterranean Quality Status Report.
- ICES. 2011. Report of the Study Group on Integrated Monitoring of Contaminants and Biological Effects (SGIMC), 14–18 March 2011, Copenhagen, Denmark. ICES CM 2011/ACOM:30. 265 pp.
- Klionsky, D.J., Emr, S.D., 2000. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290, 1717-1721.
- Köhler, A., 1991. Lysosomal perturbations in fish liver as indicators for toxic effects of environmental pollution. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C, 123-127.
- Köhler, A. Pluta, H.J., 1995. Lysosomal injury and MFO activity in the liver of flounder (*Platichthys flesus* L.) in relation to histopathology of hepatic degeneration and carcinogenesis. *Mar. Environ. Res.* 39, 255-260.
- Laplante, M., Sabatini, D.M., 2012. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149, 274-293.
- Lowe, D.M., 1988. Alteration in the cellular structure of *Mytilus edulis* resulting from exposure to environmental contaminants under field and experimental conditions. *Mar. Ecol., Prog. Ser.* 46, 91-100.
- Lowe, D., Moore M.N., Evans B.M., 1992. Contaminant impact on interactions of molecular probes with lysosomes in living hepatocytes from dab *Limanda limanda*. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 91, 135-140.
- Lowe, D.M., Soverchia C., Moore M.N., 1995. Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. *Aquatic Toxicol.* 33, 105-112.
- Martínez-Gómez, C., Bignell, J. and Lowe, D., 2015. Lysosomal membrane stability in mussels. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences* No. 56. 41 pp.
- Moore, M.N., 1976. Cytochemical demonstration of latency of lysosomal hydrolases in digestive gland cells of the common mussel *Mytilus edulis*, and changes induced by thermal stress. *Cell Tissue Res.* 175, 279-287.
- Moore, M.N., 2008. Autophagy as a second level protective process in conferring resistance to environmentally-induced oxidative stress. *Autophagy* 4, 254-256.
- Moore, M.N., Koehn, R.K., Bayne, B.L., 1980. Leucine aminopeptidase (aminopeptidase-1), N-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase and lysosomes in the mussel *Mytilus edulis* L., in response to salinity changes. *J. Exp. Zool.* 214, 239-249.
- Moore, M.N., Lowe, D. and Köhler, A. 2004. Biological effects of contaminants: Measurement of lysosomal membrane stability. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*. No. 36. 39 pp.

Moore, M.N., Viarengo, A., Donkin, P., Hawkins, A.J., 2007. Autophagic and lysosomal reactions to stress in the hepatopancreas of blue mussels. *Aquat. Toxicol.* 84, 80-91.

Moore, M.N., Koehler, A., Lowe, D. & Viarengo, A., 2008. Lysosomes and autophagy in aquatic animals. In: *Methods in Enzymology* (D. Klionsky, Ed), 451, 582-620. Academic Press/Elsevier, Burlington.

Moore, M.N., Viarengo, A., Somerfield, P.J., Sforzini, S., 2012. Linking lysosomal biomarkers and ecotoxicological effects at higher biological levels. In *Ecological Biomarkers: Indicators of Ecotoxicological Effects* (Editors: C. Amiard-Triquet, J.C. Amiard, P.S. Rainbow). Pp. 107-130.

Moore, M.N., Shaw, J.P., Ferrar Adams, D.R., Viarengo, A., 2015. Anti-oxidative cellular protection effect of fasting-induced autophagy as a mechanism for hormesis. *Mar. Environ. Res.* 107, 35-44.

OSPAR Commission, 2013. Background document and technical annexes for biological effects monitoring, Update 2013. 239 pp.

Seglen, P.O., 1983. Inhibitors of lysosomal function. *Meth. Enzymol.* 96, 737-765.

Sforzini, S., Moore, M.N., Oliveri, C., Volta, A., Jha, A., Banni, M., Viarengo, A., 2018a. Role of mTOR in autophagic and lysosomal reactions to environmental stressors in molluscs. *Aquat. Toxicol.* 195, 114-128.

Sforzini, S., Oliveri, C., Orrù, A., Chessa, G., Jha, A., Viarengo, A., Banni, M., 2018b. Application of a new targeted low density microarray and conventional biomarkers to evaluate the health status of marine mussels: A field study in Sardinian coast, Italy. *Sci. Total Environ.* 628-629, 319-328.

Soulard, A., Cohen, A., Hall, M.N., 2009. TOR signaling in invertebrates. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 825-836.

Speigel, M.R., 1961. *Statistics. Schaum's Outline Series.* Mc Graw-Hill Book Company, 359 p.

Svendsen, C., Spurgeon, D.J., Hankard, P.K., Weeks, J.M., 2004. A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? *Ecotoxicol Environ Saf.* 57, 20-29.

UNEP/RAMOG (1999). *Manual on the Biomarkers Recommended for the UNEP/MAP MED POL Biomonitoring Programme.* UNEP, Athens.

Viarengo, A., 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *Aquat. Sci. Review* 1, 295-317.

Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A., 2007a. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol. C* 146, 281-300.

Widdows, J., Bayne, B., Donkin, P., Livingstone, D., Lowe, D., Moore, M., & Salkeld, P., 1981. Measurement of the responses of mussels to environmental stress and pollution in Sullom Voe: A base-line study. *Proc. R. Soc. Edin. Section B. Biological Sciences* 80, 323-338.