



NATIONS
UNIES

EP

UNEP/MED WG.492/6



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

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 pour l'indicateur commun 18 de l'IMAP

Mise en œuvre de l'indicateur commun 18 de l'IMAP sur la biosurveillance

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 à la Décision IG.24/14 sur le Programme de travail et le budget pour 2020-2021 adoptée par la COP 21 (Naples, Italie, 2-5 décembre 2019), les Parties contractantes ont demandé au Secrétariat (Programme MED POL) d'aider les laboratoires nationaux MED POL/IMAP à appliquer les bonnes pratiques de laboratoire pour la surveillance des contaminants dans les biotes et les sédiments, y compris l'organisation des essais d'aptitude (EA) et l'application des protocoles QA/QC (c'est-à-dire l'Activité 2.4.1.3), ainsi qu'à harmoniser et normaliser les méthodes de surveillance et d'évaluation de la pollution et des déchets marins conformément à l'IMAP (c-à-d. Activité 2.4.1.4). La Décision IG. 23/6 sur le QSR MED 2017 adoptée par la COP 20 (Tirana, Albanie, 17-20 décembre 2017) a souligné la nécessité de poursuivre les développements dans les domaines suivants afin de combler les lacunes liées à la mise en œuvre de l'indicateur commun 18 de l'IMAP : i) confirmation de la valeur ajoutée des batteries de biomarqueurs dans la surveillance marine à long terme en tant que systèmes « d'alerte précoce » ; ii) test de nouveaux outils éprouvés par la recherche tels que « OMICS » ; iii) harmonisation de la qualité analytique, iv) développement des méthodes d'évaluation chimique et biologique intégrées ; ainsi que, v) révision de la portée des programmes de surveillance des effets biologiques.

L'intention du Secrétariat est d'aider les Parties contractantes à établir un schéma opérationnel au niveau national pour la mise en œuvre de l'indicateur commun 18 de l'IMAP, par le développement de lignes directrices/protocoles de surveillance spécifiques traitant de l'échantillonnage, de la préparation et de l'analyse des échantillons, ainsi que par la fourniture d'un renforcement des capacités connexes. Dans ce but, dans le présent document, le programme PNUE/PAM-MED POL a préparé une proposition pour la mise en place de tests d'interétalonnage et l'organisation d'un cours de formation pour soutenir l'Assurance qualité de la biosurveillance.

À cet égard, il convient de noter que le lancement du cours de formation et d'essais d'aptitude pour quatre biomarqueurs soutiendra les efforts des laboratoires nationaux compétents en matière d'IMAP, non seulement pour vérifier l'exactitude des résultats d'analyse des laboratoires, mais aussi pour évaluer leurs performances analytiques. Les essais d'aptitude tiennent compte des connaissances acquises lors de la réalisation du précédent Programme de biosurveillance MED POL, ainsi que de la pratique optimale de projets internationaux similaires. Ce nouveau volet de l'exercice d'interétalonnage lié à l'indicateur commun 18 de l'IMAP complétera la mesure de la performance qui a été fournie par des essais d'aptitude et des cours de formation pour l'indicateur commun 17 de MEDPOL IV/IMAP grâce à la collaboration du PNUE/PAM et de l'Agence internationale de l'énergie atomique/Laboratoire pour les études sur le milieu marin (AIEA/MESL). La réunion devrait discuter et approuver cette proposition afin de soutenir le renforcement de la mise en œuvre de l'indicateur commun 18 de l'IMAP.

Comme indiqué dans la décision IG. 23/6, les Parties contractantes ont également demandé la poursuite du développement des méthodes d'évaluation chimique et biologique intégrées. Par conséquent, alors que l'accent était mis sur le soutien primaire de la mise en œuvre de la composante de biosurveillance de l'IMAP au niveau national et régional, le Programme PNUE/PAM-MED POL a entrepris quelques réflexions sur la surveillance chimique et biologique intégrée afin d'apporter un développement possible de la portée de la surveillance de l'IC 18 de l'IMAP pour une discussion préliminaire lors de la présente réunion du CorMon sur la surveillance de la pollution.

Table des matières

1	L'exercice d'interétalonnage pour soutenir l'Assurance qualité liée à l'indicateur commun 18 de l'IMAP	1
1.1	Interétalonnage de la stabilité des membranes lysosomales (LMS).....	1
1.2	Interétalonnage de la fréquence des micronoyaux (Mni)	2
1.3	Interétalonnage de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE)	2
1.4	Interétalonnage du Stress on Stress (SoS).....	2
1.5	Évaluation de la performance des laboratoires nationaux compétents pour l'analyse des biomarqueurs	3
2	Cours de formation visant à renforcer la mise en œuvre de l'indicateur commun 18 de l'IMAP	3
3	Première réflexion sur l'évolution possible de la biosurveillance liée à l'indicateur commun 18 de l'IMAP	4
4	Approche possible de l'évaluation intégrée des données de surveillance biologique et chimique des indicateurs communs 17 et 18 de l'IMAP.....	5
4.1	Module chimique.....	6
4.2	Module biologique	7
4.3	Module d'intégration.....	7
4.4	Avantage de l'approche intégrative pour la quantification des effets globaux des contaminants pour l'évaluation du milieu marin	8

Annexe I : Références

List des abréviations / acronymes

AChE	Activité de l'acétylcholinestérase
BAC	Critères d'évaluation de base
Bio Risk	Risque biologique
Chem Risk	Risque chimique
CI	Indicateur commun
Ci	Concentration du contaminant i dans la matrice environnementale
COP	Conférence des parties
CORMON	Groupe de correspondance sur la surveillance
EAC	Critères d'évaluation environnementale
EcAp	Approche écosystémique
AEE	Agence européenne pour l'environnement
CE	Commission européenne
Env RI	Indice de risque environnemental
UE	Union européenne
Exp-DSS	Système expert d'aide à la décision
FAO	Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
BEE	Bon état écologique
HELCOM	Commission pour la protection du milieu marin dans la zone de la mer Baltique – Commission d'Helsinki
AIEA	Agence internationale de l'énergie atomique
IMAP	Programme de surveillance et d'évaluation intégrées de la mer et des côtes méditerranéennes et critères d'évaluation connexes
LMS	Stabilité de la membrane lysosomale
PAM	Plan d'action pour la Méditerranée
MED POL	Programme coordonné de surveillance continue et de recherche en matière de pollution dans la Méditerranée
MED QSR	Rapport sur l'état de la qualité de la Méditerranée
MESL	Laboratoire pour les études sur le milieu marin
MNi	Fréquence des micronoyaux
OSPAR	Convention pour la protection du milieu marin de l'Atlantique du Nord-Est
AQ/CQ	Assurance qualité/Contrôle qualité
QSR	Rapport sur l'état de la qualité
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
PECi	Effet probable de concentration du contaminant I, au-delà duquel des effets négatifs sont susceptibles de se produire
SoS	Stress on Stress
TECi	Effet de seuil de concentration du contaminant i, en dessous duquel aucun effet ne sera probablement évident
TPCitec	Contribution à la pression toxique du contaminant i
Unité de toxicité	Effets de seuils des différents contaminants pouvant commencer à avoir des effets toxiques sur les organismes
TV	Valeur de toxicité
PNUE/PAM	Programme des Nations unies pour l'environnement Plan d'action pour la méditerranée
wF	facteur de pondération

Table des matières

1	L'exercice d'interétalonnage pour soutenir l'Assurance qualité liée à l'indicateur commun 18 de l'IMAP	1
1.1	Interétalonnage de la stabilité des membranes lysosomales (LMS).....	1
1.2	Interétalonnage de la fréquence des micronoyaux (Mni)	2
1.3	Interétalonnage de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE)	2
1.4	Interétalonnage du Stress on Stress (SoS).....	2
1.5	Évaluation de la performance des laboratoires nationaux compétents pour l'analyse des biomarqueurs	3
2	Cours de formation visant à renforcer la mise en œuvre de l'indicateur commun 18 de l'IMAP	3
3	Première réflexion sur l'évolution possible de la biosurveillance liée à l'indicateur commun 18 de l'IMAP	4
4	Approche possible de l'évaluation intégrée des données de surveillance biologique et chimique des indicateurs communs 17 et 18 de l'IMAP.....	5
4.1	Module chimique.....	6
4.2	Module biologique	7
4.3	Module d'intégration.....	7
4.4	Avantage de l'approche intégrative pour la quantification des effets globaux des contaminants pour l'évaluation du milieu marin	8

Annexe I: Références

1 L'exercice d'interétalonnage pour soutenir l'Assurance qualité liée à l'indicateur commun 18 de l'IMAP

1. Les Protocoles pour l'Assurance qualité (QA) des indicateurs communs du Cluster Pollution de l'IMAP, y compris l'IC 18, sont fournis dans le document PNUE/MED WG.492/7. Un aspect très important de l'Assurance qualité (QA) de l'IC 18 est la réalisation d'un exercice d'interétalonnage qui est fondamental pour garantir la comparabilité des données des biomarqueurs recueillies par les laboratoires nationaux compétents. L'organisation de l'exercice d'interétalonnage relatif à l'IC 18 doit être confiée à un laboratoire de référence compétent.

2. Les résultats de l'exercice d'interétalonnage réalisé dans la phase initiale du Programme de biosurveillance MED POL ont été publiés dans la revue scientifique internationale *Marine Environmental Research* en 2000 (Viarengo *et al.*, 2000). Il s'agit de la première tentative réussie au niveau international pour garantir la comparabilité des données sur les biomarqueurs. Les pratiques d'interétalonnage proposées ici représentent l'évolution naturelle des activités passées. Ils prennent en compte les connaissances acquises lors de la réalisation du Programme de biosurveillance MED POL, ainsi que des programmes de surveillance internationaux similaires (p. ex., le Programme de recherche financé par l'UE réalisé en 1998 « The Biological Effects Quality Assurance in Monitoring Programmes (BELQUAM) » ; le projet « Biological Effects of Environmental Pollution in marine coastal ecosystems » [BEEP] soutenu par l'UE en 2002 ; le document de base et les annexes techniques pour la surveillance des effets biologiques de la Commission OSPAR, mis à jour en 2013).

3. Le présent document fournit les détails relatifs à la réalisation de l'exercice d'interétalonnage concernant les quatre biomarqueurs sélectionnés pour la biosurveillance dans le cadre de l'IC 18. En raison des différences dans les méthodologies utilisées pour la collecte des données pour les différents biomarqueurs, les activités d'interétalonnage sont élaborées séparément pour les quatre différentes analyses de biomarqueurs.

1.1 Interétalonnage de la stabilité des membranes lysosomales (LMS)

a. Interétalonnage de la LMS évaluée par la méthode histochimique sur des échantillons de tissus congelés

4. Dans le cadre de l'Assurance qualité (QA) de l'IC 18 de l'IMAP, le Laboratoire de référence chargé d'organiser l'exercice d'interétalonnage, préparera et analysera des échantillons de témoins non contaminés et d'organismes exposés aux contaminants. Des sous-échantillons de tissus congelés dans l'azote liquide de deux échantillons seront envoyés aux laboratoires nationaux compétents participant à l'exercice d'interétalonnage. Les échantillons seront codés et le test sera réalisé en aveugle. Ce type d'activité d'interétalonnage a été utilisé avec succès ces dernières années dans le cadre du précédent Programme de biosurveillance MED POL (Viarengo *et al.*, 2000).

b. Comparaison interlaboratoires (CIL) d'une expérience d'exposition in vivo avec évaluation subséquente par la méthode histochimique

5. Cette approche a déjà été utilisée dans le Programme de biosurveillance MED POL pour l'activité d'interétalonnage sur les mollusques. Les laboratoires nationaux compétents participant à l'activité d'interétalonnage recevront du Laboratoire de référence un jeu de flacons contenant 10 ml d'eau de mer pure ou contaminée. Les flacons seront codés et le test sera réalisé en aveugle. Le contenu du flacon doit être ajouté à 20 l d'eau de mer aérée maintenue à 16 °C dans laquelle une expérience d'exposition de 3 jours avec 20 moules doit être réalisée. Pendant les expériences, l'eau ne doit pas être changée et les moules ne doivent pas être nourries. Les laboratoires sont chargés d'identifier les échantillons contaminés et d'évaluer la variation de la LMS (en %). Les images des coupes de cryostat analysées seront envoyées au laboratoire de référence chargé de la réalisation de la CIL pour confirmer la qualité des résultats.

c. Interétalonnage de la LMS évaluée par la méthode du Temps de rétention du rouge neutre in vivo

6. Comme pour la CIL décrite en b., les laboratoires nationaux compétents participants recevront un jeu de flacons contenant 10 ml d'eau de mer propre ou contaminée. Les flacons seront codés et le

test sera réalisé en aveugle. Le contenu de chaque flacon doit être ajouté à des réservoirs contenant 20 l d'eau de mer aérée maintenue à 16 °C pour réaliser une expérience d'exposition de 3 jours avec 20 moules. Pendant les expériences, l'eau ne doit pas être changée et les moules ne doivent pas être nourries.

1.2 Interétalonnage de la fréquence des micronoyaux (Mni)

a. Comparaison interlaboratoires :

7. La phase la plus critique du protocole expérimental de l'essai MN est la notation des lames.

8. Un exercice de notation d'interétalonnage est recommandé dans les laboratoires nationaux compétents impliqués dans l'utilisation du test MN à des fins de biosurveillance. Les lames microscopiques des témoins et des organismes exposés aux contaminants, préparées et analysées dans le Laboratoire de référence chargé de réaliser l'exercice d'interétalonnage, seront envoyées aux laboratoires nationaux compétents participants. Les échantillons seront codés et la notation sera réalisée en aveugle.

9. Pour garantir la qualité des données au cours des différentes activités de biosurveillance, il sera également possible de demander aux laboratoires impliqués d'envoyer quelques lames provenant d'un site de référence et d'un site pollué au Laboratoire de référence chargé de la réalisation de l'exercice d'interétalonnage. De cette façon, aussi bien la qualité des cellules que les résultats MN seront évalués de manière adéquate.

1.3 Interétalonnage de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE)

a. Comparaison interlaboratoires de l'AChE sur des échantillons de tissus congelés

10. Comme pour la LMS, Le Laboratoire de référence chargé d'organiser l'exercice d'interétalonnage, dans le cadre de l'Assurance qualité (QA) de l'IMAP CI 18, préparera et analysera des échantillons de témoins non contaminés et d'organismes exposés aux contaminants. Des sous-échantillons de tissus congelés dans l'azote liquide des deux échantillons seront envoyés aux laboratoires nationaux compétents participant à l'exercice d'interétalonnage. Les échantillons seront codés et l'essai sera réalisé en aveugle. Ce type d'activité d'interétalonnage a été utilisé avec succès dans le cadre du précédent Programme de biosurveillance MEDPOL (Viarengo *et al.*, 2000).

b. Comparaison interlaboratoires (CIL) d'une expérience d'exposition in vivo pour l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) avec évaluation subséquente par la méthode histochimique

11. Cette approche a été utilisée dans Programme de biosurveillance MEDPOL pour l'interétalonnage des biomarqueurs de mollusques. Les laboratoires nationaux compétents participant à l'activité d'interétalonnage recevront du Laboratoire de référence un jeu de flacons contenant 10 ml d'eau de mer pure ou contaminée. Les flacons seront codés et le test sera réalisé en aveugle. Le contenu du flacon doit être ajouté à 20 l d'eau de mer aérée maintenue à 16 °C dans laquelle une expérience d'exposition de 3 jours avec 20 moules doit être réalisée. Pendant les expériences, l'eau ne doit pas être changée et les moules ne doivent pas être nourries. Les laboratoires sont chargés d'identifier les échantillons contaminés et d'évaluer la variation de l'AChE (en %).

1.4 Interétalonnage du Stress on Stress (SoS)

12. La méthode est simple et, en général, ne nécessite pas de protocole d'interétalonnage complexe. Il est toujours possible de suivre la même procédure que celle utilisée pour l'interétalonnage de la stabilité de la membrane lysosomale afin de s'assurer que toutes les étapes requises pour l'évaluation du SoS sont mises en œuvre correctement. En outre, comme pour les autres biomarqueurs décrits ici, un ensemble de vidéos devra être réalisé et envoyé au laboratoire qui sera chargé par le PNUE/PAM d'effectuer l'Assurance qualité (QA) de l'indicateur commun 18 de l'IMAP pour une évaluation critique de la modalité d'acquisition des données.

1.5 Évaluation de la performance des laboratoires nationaux compétents pour l'analyse des biomarqueurs

13. Pour l'analyse des biomarqueurs sélectionnés, les laboratoires nationaux participants doivent être en mesure de répondre aux critères particuliers décrits ci-dessus pour être considérés comme conformes à la norme de qualité (QA).

14. Stabilité de la membrane lysosomale (LMS) : les laboratoires nationaux compétents doivent être en mesure d'identifier, parmi les échantillons aveugles, ceux qui proviennent d'animaux témoins et ceux qui proviennent d'animaux exposés à des substances chimiques toxiques. Dans le cas de l'évaluation de la LMS, les laboratoires nationaux compétents doivent également être en mesure de quantifier les effets toxiques, c'est-à-dire de vérifier si les effets sur les animaux exposés aux contaminants entraînent une diminution de la valeur LMS entre 20 et 70 % ou si la diminution est supérieure à 70 %. Les laboratoires qui ne sont pas en mesure d'évaluer correctement les changements quantitatifs de la LMS doivent être formés pour atteindre les normes de qualité requises. Le Laboratoire de référence doit être chargé d'assurer cette formation et d'aider à l'évaluation des données.

15. Fréquence des micronoyaux (MN), activité de l'acétylcholinestérase (activité AChE) et Stress on Stress (SoS). Les laboratoires nationaux compétents doivent être en mesure d'identifier les échantillons provenant d'animaux témoins et ceux provenant d'animaux exposés à des produits chimiques toxiques. Les laboratoires qui ne sont pas en mesure d'identifier correctement les différences de valeurs de la fréquence des MN, de l'activité de l'AChE et du SoS chez les animaux témoins et exposés doivent être formés pour atteindre les normes de qualité requises. Les données concernant la quantification des changements de ces biomarqueurs chez les animaux témoins et les animaux exposés aux produits chimiques seront utilisées par le laboratoire chargé de réaliser les tests d'interétalonnage afin de s'assurer que les laboratoires analysent les biomarqueurs de manière correcte.

16. Les laboratoires nationaux compétents qui ne parviennent pas à reconnaître les contrôles et les échantillons exposés aux contaminants, ou qui constatent des variations anormales du pourcentage dans certains échantillons provenant de l'un des exercices d'interétalonnage/de comparaison interlaboratoires, peuvent envoyer les images prises pendant l'analyse au Laboratoire de référence chargé de la réalisation des exercices, qui accélérera l'évaluation des résultats en tant que service supplémentaire.

17. Dans le précédent Programme de biosurveillance MED POL, la plupart des laboratoires nationaux participants renvoyaient les images et/ou les vidéos prises pendant l'analyse des biomarqueurs respectifs, ainsi que la clarification d'éventuels problèmes techniques. Le Laboratoire de référence a ainsi pu les aider à distance.

18. Dans le passé, les laboratoires participants recevaient des caméras vidéo pour enregistrer les analyses. Compte tenu de la disponibilité de nouvelles technologies d'imagerie, telles que les téléphones intelligents dotés d'appareils photo de haute qualité, cela n'est plus nécessaire et l'interface entre les laboratoires nationaux compétents et le Laboratoire de référence chargé de réaliser les exercices d'interétalonnage et de CIL sera beaucoup plus simple et sans coût de matériel supplémentaire.

2 Cours de formation visant à renforcer la mise en œuvre de l'indicateur commun 18 de l'IMAP

19. Un cours de formation de six jours devrait être organisé afin d'apprendre aux praticiens des laboratoires nationaux compétents comment mettre en œuvre et exécuter la surveillance et l'évaluation des biomarqueurs liés à l'IC 18. La conduite de cette formation doit être confiée à un laboratoire compétent reconnu, de préférence le même que celui qui est responsable de la réalisation des tests d'interétalonnage pour l'IC 18, comme expliqué ci-dessus au chapitre 1 (c'est-à-dire le Laboratoire de référence).

20. Le cours de formation doit aborder les aspects expérimentaux tant théoriques que pratiques :

- i) Dans un premier temps, il est nécessaire de démontrer comment organiser le programme de biosurveillance pour l'IC 18 de l'IMAP. Ensuite, la signification biologique de la détermination des biomarqueurs doit être expliquée et discutée. Enfin, les détails de l'Assurance qualité doivent être présentés afin d'obtenir la pleine participation de tous les laboratoires nationaux compétents à cette activité fondamentale. Cette partie initiale doit être fournie sous forme de cours magistral avec tutoriel.
- ii) La deuxième partie du cours de formation doit être consacrée aux activités expérimentales. En laboratoire, les chercheurs doivent évaluer trois biomarqueurs sélectionnés (c'est-à-dire la LMS, la fréquence des MN et l'activité de l'AChE) avec le soutien d'experts de renommée internationale qui doivent clarifier tous les problèmes techniques.
- iii) La troisième partie du cours de formation devrait être liée à l'utilisation d'un ensemble de données sur les biomarqueurs. Les données doivent être intégrées à différents systèmes et les résultats discutés. Par la suite, une nouvelle approche pour l'intégration de la surveillance biologique et chimique, telle qu'elle est présentée au chapitre 4 du présent document, doit être introduite. Elle doit comprendre une explication de la manière optimale de rapporter et de télécharger les données de surveillance liées à l'IC 18 dans le système d'information de l'IMAP.

21. Pendant le cours de formation, les sessions doivent être organisées de manière à encourager les chercheurs à discuter entre experts nationaux, notamment des problèmes et des préoccupations techniques liés à l'utilisation des différents biomarqueurs. La mise en réseau durable au-delà de la durée de la formation doit être encouragée.

22. Le coût de la mise en œuvre de l'atelier pour 12 participants est évalué à 41 000 USD. Ce montant couvre les coûts liés à l'organisation des conférences, à la formation pratique dispensée par le laboratoire expert, ainsi qu'au voyage et à l'hébergement des experts nationaux.

23. Les procédures et critères de nomination des experts nationaux pour la participation à l'exercice d'interétalonnage et au cours de formation devraient être établis après l'approbation attendue des propositions élaborées ici.

3 Première réflexion sur l'évolution possible de la biosurveillance liée à l'indicateur commun 18 de l'IMAP

24. Il convient d'explorer l'application de nouveaux biomarqueurs pour soutenir le renforcement de la surveillance et de l'évaluation de l'IC 18, notamment les suivants :

- i) *Application des biomarqueurs du stress oxydant* : en plus des biomarqueurs déjà approuvés pour l'IC 18, l'application des biomarqueurs du stress oxydant devrait être testée. À cet égard, l'application de la Carbonylation des protéines et de l'accumulation de Lipofuscine lysosomale est recommandée. La Carbonylation des protéines est un biomarqueur capable de mettre en évidence les protéines endommagées par le stress oxydant, dont la plupart seront incapables de remplir leur rôle biochimique normal, affectant ainsi l'état physiologique des cellules. L'accumulation de Lipofuscine lysosomale représente les produits finaux du dommage oxydant des composants cellulaires, qui sont accumulés dans les lysosomes, comme la première étape avant leur élimination des cellules par exocytose constitue un excellent indice du niveau de dommage oxydant dans les cellules de différents tissus des organismes exposés à des produits chimiques toxiques. La lipofuscine fixe également les métaux de transition tels que le fer, qui continueront à aggraver les dommages oxydants causés aux constituants cellulaires. Par conséquent, l'accumulation lysosomale de lipofuscine est un processus nocif.
- ii) *Nouvelles technologies moléculaires « OMICS »* : l'introduction de ces technologies dans le programme de biosurveillance de l'IC 18, en particulier de l'approche transcriptomique, doit être testée. La transcriptomique est utilisée depuis vingt ans maintenant, à la fois pour la médecine et pour des applications environnementales. Les laboratoires méditerranéens devraient donc explorer son application future dans le cadre de la mise en œuvre de l'IC 18.
- iii) *Les changements dans l'expression des gènes liés aux processus biologiques fondamentaux* : les résultats de la recherche dans le domaine de la transcriptomique chez les organismes marins

offrent un moyen possible de sélectionner les batteries de gènes connus pour être très réactifs au stress causé par les produits chimiques toxiques chez les animaux. Ces gènes sont liés à des processus biologiques fondamentaux, tels que la synthèse des protéines, l'autophagie, le métabolisme énergétique, l'organisation du cytosquelette, le stress oxydant, les lésions de l'ADN, les voies de signalisation cellulaire (par exemple, PI3K-Akt-mTOR) et les réactions à des classes spécifiques de contaminants tels que les métaux lourds et les xénobiotiques organiques aromatiques (HAP, PCB, etc.). On sait que les modifications de l'expression de ces gènes sont liées à des altérations particulières des biomarqueurs et, par conséquent, au niveau de stress des organismes. À cette fin, il est recommandé d'appliquer la méthodologie transcriptomique la plus robuste et la plus simple, telle que l'approche qRT-PCR pour l'analyse de certains gènes exprimés de manière différentielle. Plusieurs avantages justifient l'application de cette approche, à savoir qu'elle est capable de produire des données quantitatives, qu'il s'agit d'une méthodologie standardisée au niveau international, qu'elle est utilisée sur des fragments d'ADN, qu'elle constitue une étape de base pour l'analyse transcriptomique et qu'elle peut également être facilement interétalonnée. En outre, la plupart des laboratoires possèdent l'équipement nécessaire à son application et les coûts d'une seule analyse sont faibles.

25. Le présent document porte les nouveaux biomarqueurs énumérés ci-dessus à l'attention des Parties afin de déclencher une discussion pour guider leur élaboration scientifique ultérieure dans le cadre de la mise en œuvre de l'IC 18.

4 Approche possible de l'évaluation intégrée des données de surveillance biologique et chimique des indicateurs communs 17 et 18 de l'IMAP

26. Il est bien connu que de nombreux contaminants présents dans le milieu marin peuvent entraîner une diminution de l'intégrité de l'écosystème (c'est-à-dire de la santé du milieu marin en provoquant des effets négatifs sur la santé des organismes individuels), ainsi que des conséquences à plus long terme sur la biodiversité.

27. Les nombreux produits chimiques toxiques présents dans l'environnement peuvent avoir des effets additifs ou synergiques (ou, parfois, à faible concentration, des effets antagonistes) sur les organismes vivants ; cependant, jusqu'à présent, il a été impossible de donner une évaluation prédictive des effets nocifs possibles de mélanges complexes de contaminants sur les organismes qui peuplent l'écosystème contaminé (Barranger *et al.*, 2019a, b ; Moore *et al.*, 2013, 2021).

28. La législation de la plupart des pays utilise des limites légales de toxicité pour les polluants individuels pour décrire la qualité de l'environnement, bien qu'il soit bien connu que les effets des produits chimiques sont souvent additifs et parfois synergiques. Cependant, dans la législation de nombreux pays, la limite légale de certaines classes de produits chimiques toxiques, comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les dibenzodioxines (et dibenzofuranes) polychlorés, est souvent exprimée comme la somme des concentrations des composants de la classe de contaminants.

29. La présente approche explique une procédure à deux volets qui combine des données chimiques et écotoxicologiques pour soutenir l'évaluation du risque lié aux organismes marins exposés aux eaux et sédiments contaminés. L'objectif principal de cette procédure est d'aider les scientifiques et les gestionnaires de l'environnement à planifier les actions et interventions futures pour la gestion des côtes marines en déterminant clairement les risques environnementaux potentiels associés à l'exposition des organismes à cette contamination.

30. Dans cette approche, la concentration seuil avec effet (CSE) est utilisée comme unité de toxicité pour les différents produits chimiques afin d'estimer leurs effets additifs. Dans ce cas, le terme « unité de toxicité » est utilisé pour indiquer la concentration des différents produits chimiques capables de commencer à produire des effets toxiques sur les organismes. Ce calcul peut sous-estimer la toxicité possible due aux effets synergiques des substances chimiques présentes dans l'environnement contaminé, mais cette situation est compensée par la présence des données biologiques : en effet, les effets synergiques possibles des contaminants seront révélés par un effet nocif plus élevé sur l'état de santé de l'organisme. La pondération plus élevée des données biologiques

(2:1 par rapport aux données chimiques) réduira la sous-estimation possible des effets synergiques des polluants.

31. La concentration seuil avec effet (CSE) et les concentrations à effet probable (CEP) sont des concentrations cibles choisies comme seuils pour chaque contaminant afin de garantir la protection de l'environnement. Les CSE sont les concentrations en dessous desquelles aucun effet ne sera probablement évident, et les CEP sont les concentrations au-dessus desquelles des effets négatifs sont susceptibles de se produire.

32. Par conséquent, l'adoption de ce modèle pour la mise en œuvre de l'indicateur commun 18 de l'IMAP devrait être étudiée comme une approche intégrative pour quantifier l'effet global des contaminants sur les espèces sentinelles, afin d'évaluer la qualité environnementale.

33. La procédure décrite ici se compose essentiellement de trois modules : (i) un module chimique pour l'intégration des données concernant la concentration des polluants ; (ii) un module écotoxicologique qui intègre les données des effets biologiques sur les organismes marins ; et (iii) un module d'intégration qui combine les deux sources de données dans un Indice de risque environnemental (EnvRI).

4.1 Module chimique

34. L'intégration des données chimiques et biologiques est basée sur les recherches rapportées par Dagnino *et al.* (2008), Dagnino *et al.* (2013), et Dagnino & Viarengo (2014). La principale différence est que, initialement, la valeur de la contribution de chaque substance chimique à la toxicité de la matrice est considérée séparément.

35. Il repose sur le calcul de l'Indice de risque chimique (ChemRI) qui est déterminé sur la base des données relatives aux concentrations de substances chimiques sélectionnées dans les eaux, les sédiments ou les deux, par rapport à leurs concentrations seuil avec effet (CSE) et à leurs concentrations à effet probable (CEP) sur le biote.

36. Le cadre d'intégration du Module chimique est basé sur trois points principaux :

- i) la comparaison de la concentration mesurée de chaque produit chimique (C_i) avec sa CSE et l'évaluation pour chaque produit chimique d'une Valeur de toxicité (VT) en utilisant ses seuils spécifiques à la CSE, et
- ii) le calcul de sa Contribution à la pression toxique (TPCitec) en utilisant sa valeur CEP ; la TPCitec sera utilisée pour calculer la contribution du produit chimique toxique i au ChemRI ; et enfin,
- iii) la Contribution à la pression toxique (TPCitec) des différents produits chimiques toxiques qui sont ensuite additionnés pour obtenir les valeurs de ChemRI qui seront comprises entre 0 et 1. Pour organiser les données afin d'obtenir une valeur comprise entre 0 et 1, il est essentiel d'utiliser les données chimiques, ainsi que les données biologiques (état de santé des organismes sentinelles) qui seront également déterminées comme étant comprises entre 0 et 1.

37. La justification du calcul séparé de la contribution toxique des différents produits chimiques est que le rapport entre la CSE et la CEP des différents produits chimiques peut varier de 2 à 10 ou plus (par exemple pour Hg : CSE = 130 et CEP = 700, ce qui donne CSE:CEP = 5 ; et pour le Cd : CSE = 68 et CEP = 4210, ce qui donne CSE:CEP = 62).

38. Les valeurs des critères d'évaluation biologique (BAC) définis dans la Décision 23/6 de l'IMAP représentent les valeurs d'un contaminant particulier dans les zones méditerranéennes non polluées ; par conséquent, c'est la plus faible des valeurs CSE, qui représente les valeurs du produit chimique, qui ne doivent pas être dépassée afin d'éviter les effets toxiques sur les organismes.

39. Les valeurs EAC (critères d'évaluation environnementale) définies dans la Décision 23/6 de l'IMAP représentent les valeurs d'un contaminant particulier dans une zone contaminée dans laquelle des effets toxiques sur le biote sont présents ; par conséquent, cette valeur peut être supérieure à la CEP qui indique la valeur de concentration à laquelle il est possible de trouver des altérations négatives de l'état de santé des organismes.

40. Dans le Module chimique proposé, si la concentration d'un contaminant atteint sa valeur EAC (critères d'évaluation environnementale), l'Indice de risque chimique (ChemRI) est de 1.

4.2 Module biologique

41. Ce module est basé sur l'approche d'intégration des données de biomarqueurs qui est utilisée dans le Système expert pour les moules (Dagnino *et al.*, 2007). Étant donné que l'utilisation de quatre biomarqueurs a été agréée dans l'IC 18 de l'IMAP, l'intégration des données pour l'évaluation du risque biologique (Bio Risk) a été simplifiée.

42. Les biomarqueurs de l'IC 18 de l'IMAP sont : (i) trois biomarqueurs au niveau cellulaire (alerte précoce), à savoir la stabilité de la membrane lysosomale (LMS), l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE), la fréquence des micronoyaux (Mn) ; et (ii) un biomarqueur au niveau de l'organisme tel que le Stress on Stress (SoS).

43. Les règles d'utilisation des données de biomarqueurs sont décrites ci-dessous. Comme on l'a vu, une importance particulière est accordée aux changements de la valeur de la LMS : en effet, ce biomarqueur ne sert pas seulement à diagnostiquer un syndrome de stress dans l'organisme, mais il permet aussi de pronostiquer les effets possibles au niveau de la population/communauté (Moore *et al.*, 2006 a & b). Une réduction de la LMS équivaut à une augmentation de la perméabilité de la membrane lysosomale, ce qui entraîne la libération de fer lysosomal et, dans les cas graves, la libération d'enzymes lysosomales dégradantes (hydrolases) (Stern *et al.*, 2012). La libération du fer lysosomal entraîne la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) nocives : les ERO peuvent entraîner un stress oxydant et une pathologie chez les animaux (Moore *et al.*, 2020). La stabilité de la membrane lysosomale (LMS) peut donc être définie comme un « biomarqueur pronostique ». En effet, il a été démontré qu'une diminution drastique de la LMS est associée à des altérations radicales au niveau des tissus (dus à une réduction du volume cytoplasmique des cellules et à la perte de certaines de leurs fonctions physiologiques) avec des conséquences délétères sur le Potentiel de croissance de l'organisme (Moore *et al.*, 2006 a & b, 2008, 2013).

44. Évaluation du risque biologique (Bio Risk) : une « modification » d'un biomarqueur est définie comme la variation du biomarqueur de plus de 20 % par rapport à la valeur de contrôle, la variation étant statistiquement significative en utilisant un test statistique non paramétrique. Les différents facteurs de risque biologique sont définis comme suit :

- i. S'il y a une modification d'un biomarqueur au niveau cellulaire, le risque biologique est de 0,2.
- ii. S'il y a une modification de deux biomarqueurs au niveau cellulaire, le risque biologique est de 0,4.
- iii. S'il y a une modification de trois biomarqueurs au niveau cellulaire, le risque biologique est de 0,6.
- iv. S'il y a une modification d'un biomarqueur au niveau cellulaire ET une diminution significative de la valeur du biomarqueur pronostique cellulaire LMS de 70 % ou plus, le risque biologique est de 0,8.
- v. S'il y a une modification dans les trois biomarqueurs cellulaires testés,
 - a. Y COMPRIS une diminution de la valeur LMS de 70 % ou plus,
 - b. OU une modification d'un biomarqueur au niveau de l'organisme (SoS)le risque biologique est de 1.
- vi. Si la mortalité des mollusques en cage est supérieure à 20 % par rapport à la valeur de contrôle, le risque biologique est également de 1.

45. Si plus de trois biomarqueurs au niveau cellulaire sont utilisés, il est possible d'intégrer les données des biomarqueurs à l'aide d'une nouvelle version du Système expert pour les moules (Dagnino *et al.*, 2007) qui incorpore les règles utilisées pour le calcul du risque biologique.

4.3 Module d'intégration

46. Dans le Module intégré, l'Indice de risque environnemental est défini comme suit :

$$\text{EnvRI} = \frac{wF_{\text{ChemRI}} \times \text{ChemRI} + wF_{\text{BioRI}} \times \text{BioRI}}{wF_{\text{ChemRI}} + wF_{\text{BioRI}}}$$

avec

wF = Facteur de pondération

wF_{Chem Risk} = 1

wF_{Bio Risk} = 2

47. Les facteurs de pondération (wFs) proposés sont des valeurs arbitraires, choisies pour souligner l'importance des effets sur les organismes marins des contaminants toxiques présents dans l'écosystème. La valeur plus élevée du facteur de pondération attribué au risque biologique est importante, afin de mettre clairement en évidence les effets synergiques possibles des produits chimiques présents dans l'environnement contaminé.

4.4 Avantage de l'approche intégrative pour la quantification des effets globaux des contaminants pour l'évaluation du milieu marin

48. L'évaluation du risque environnemental est généralement obtenue par un « jugement d'expert » d'un groupe de scientifiques qualifiés en matière d'environnement ; toutefois, comme cela s'est souvent produit dans le passé, les résultats de l'évaluation peuvent varier considérablement en fonction du contexte scientifique national et régional spécifique des experts. La procédure d'évaluation des risques présentée ici peut donc représenter un outil important pour les gestionnaires de l'environnement ; en effet, elle leur permet d'obtenir une évaluation plus objective et quantitative du risque environnemental dérivé des effets biologiques des contaminants présents dans les écosystèmes marins. Comme le montre le texte, cette procédure prend en compte les effets additifs des produits chimiques toxiques et peut également mettre en évidence la présence d'effets biologiques synergiques et toxiques des polluants sur la base d'analyses de biomarqueurs dans les organismes sentinelles déployés dans le programme de biosurveillance.

49. La fourchette acceptable de l'Indice de risque environnemental marin, basé sur les biomarqueurs, doit encore être convenue par les Parties sur la base des recommandations des experts.

50. L'application de l'Indice de risque environnemental permettra d'obtenir des valeurs de risque objectives qui permettront aux décideurs politiques nationaux et régionaux et aux gestionnaires de l'environnement de décider des mesures à prendre pour réduire la contamination marine ou pour assainir une zone polluée. L'efficacité de ces actions peut ensuite être contrôlée et quantifiée jusqu'à ce qu'un indice de risque environnemental acceptable soit atteint.

Annexe I
Références

- Barranger, A., Langan, L.M., Sharma, V., Rance, G.A., Aminot, Y., Weston, N.J., Akcha, F., Moore, M.N., Arlt, V.M., Khlobystov, A.N., Readman, J.W., Jha, A.N., 2019a. Antagonistic interactions between benzo[a]pyrene and fullerene (C60) in toxicological response of marine mussels. *Nanomaterials (Basel)* 8;9(7). pii: E987. doi: 10.3390/nano9070987.
- Barranger, A., Rance, G.A., Aminot, Y., Dallas, L.J., Sforzini, S., Weston, N.J., Lodge, R.W., Banni, M., Arlt, V.M., Moore, M.N., Readman, J.W., Viarengo, A., Khlobystov, A.N., Jha, A.N., 2019b. An integrated approach to determine interactive genotoxic and global gene expression effects of multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) and benzo[a]pyrene (BaP) on marine mussels: evidence of reverse 'Trojan Horse' effects. *Nanotoxicology* 13, 1324-1343.
- Dagnino A, Allen JI, Moore MN, Broeg K, Canesi L, Viarengo A. 2007. Development of an expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an animal health index. *Biomarkers* 12, 155–172.
- Dagnino A, Sforzini S, Dondero F, Fenoglio S, Bona E, Jensen J, Viarengo A, 2008. A “weight-of-evidence” approach for the integration of environmental “Triad” data to assess ecological risk and biological vulnerability. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 4, 314–326.
- Dagnino A; Bo T; Copetta A; Fenoglio S; Oliveri C; Bencivenga M; Felli A; Viarengo A, 2013. Development and application of an innovative expert decision support system to manage sediments and to assess environmental risk in freshwater ecosystems. *Environ. Int.* 60, 171-182.
- Dagnino A, Viarengo A, 2014. Development of a decision support system to manage contamination in marine ecosystems. *Sci. Total Environ.* 466-467, 119-126.
- 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.
- Moore, M.N., 1988. Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 46, 81-89.
- Moore, M.N., Allen, J.I. & McVeigh, 2006a. Environmental prognostics: an integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. *Mar. Environ. Res.*, 61, 278–304.
- Moore, M.N., Allen, J.I. & Somerfield, P.J., 2006b. Autophagy: role in surviving environmental stress. *Marine Environmental Research*, 62 Suppl. 1, S420-S425.
- Moore, M.N., Koehler, A., Lowe, D. & Viarengo, A., 2008. Lysosomes and autophagy in aquatic animals. In: *Methods in Enzymology* (D.Klionsky, Ed), vol. 451, pp. 582-620. Academic Press/Elsevier, Burlington.
- Moore, M.N., Sforzini, S., Viarengo, A. et al., 2021. Antagonistic cytoprotective effects of C60 fullerene nanoparticles in simultaneous exposure to benzo[a]pyrene in a molluscan animal model., *Science of the Total Environment* 755 (2021) 142355), <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv>.
- Moore, M.N., Viarengo, A.G., Somerfield, P.J., Sforzini, S., 2013. Linking lysosomal biomarkers and ecotoxicological effects at higher biological levels. In - *Ecological Biomarkers: Indicators of Ecotoxicological Effects*, (Eds.C. Amiard-Triquet, J.C. Amiard, P.S. Rainbow), pp. 107-130. CRC Press, Boca Raton (Florida), New York & Oxford.
- Nyström, T., 2005. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J.* 24(7), 1311-1317.
- Shaw, J.P., Dondero, F., Moore, M.N., (...), Thain, J.E., Viarengo, A., 2011. Integration of biochemical, histochemical and toxicogenomic indices for the assessment of health status of mussels from the Tamar Estuary, U.K. *Mar. Environ. Res.* 72(1-2), pp. 13-24.

Stern, S.T., Adisheshaiah, P.P., Crist, R.M., 2012. Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Particle and Fibre Toxicology*, 9:20. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-9-20>.

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., Nott, J.A., 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. C, Comp. Pharmacol. Toxicol.* 104, 355-372.

Viarengo, A.; Lafaurie, M.; Gabrielides, G.P.; Fabbri, R.; Marro, A., Roméo, M., 2000. Critical evaluation of an intercalibration exercise undertaken in the framework of the MED POL biomonitoring program. *Mar. Environ. Res.* 49, 1-18.

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