



NATIONS
UNIES

EP

UNEP/MED WG.492/5



PNUE



**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 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 fréquence des micronoyaux (MNi), de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) et du stress sur le stress (SoS)

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 fréquence des micronoyaux (MN) dans les cellules sanguines de poissons (<i>Mullus barbatus</i>) et dans les cellules branchiales et les hémocytes de moules (<i>Mytilus</i> sp.)	1
2.1	Protocole pour l'analyse de la fréquence des micronoyaux (MN) dans les cellules sanguines de poissons et l'évaluation et l'interprétation des résultats	3
2.2	Protocole pour l'analyse de la fréquence des micronoyaux (MN) dans les cellules des branchies et les hémocytes de moules et l'évaluation et l'interprétation des résultats	6
3	Note technique pour l'analyse de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) dans les branchies de moules et le muscle de poisson	10
3.1	Protocole pour la préparation de l'homogénat de tissus et pour la détermination enzymatique de l'activité AChE, ainsi que pour l'évaluation et l'interprétation des résultats	11
4	Note technique pour l'analyse du « Stress on stress » (SoS) dans les moules	15
4.1	Protocole pour l'évaluation du SoS et l'interprétation des résultats	16

Annexe I: Références

List des abréviations / acronymes

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

1 Introduction

1. Ce document de travail s'inscrit dans le prolongement des lignes directrices/protocoles de surveillance pour l'analyse des biomarqueurs chez les mollusques marins (tels que *Mytilus* sp.) et les poissons (tels que *Mullus barbatus*) pour l'analyse de l'indicateur commun 18 de l'IMAP proposés dans le document UNEP/MED WG. 492/4. Y sont détaillés les protocoles pour les biomarqueurs suivants : i) activité de l'acétylcholinestérase (AChE) ; ii) fréquence des micronoyaux (MN) ; et iii) « stress on stress » (SoS).

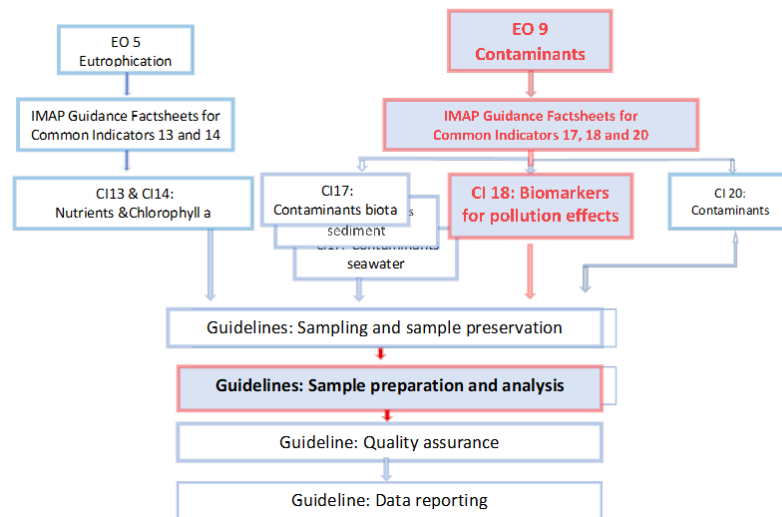


Diagramme de flux : lignes directrices pour la surveillance des objectifs écologiques 5 et 9 de l'IMAP

2 Note technique pour l'analyse de la fréquence des micronoyaux (MN) dans les cellules sanguines de poissons (*Mullus barbatus*) et dans les cellules branchiales et les hémocytes de moules (*Mytilus* sp.)

2. Les micronoyaux sont de petites entités qui contiennent de l'ADN et peuvent être présents près du noyau cellulaire pendant l'interphase ; ils sont issus de la cassure chromosomique ou d'un dysfonctionnement du fuseau mitotique. Le test du micronoyau (MN) est adapté à l'évaluation de la génotoxicité d'agents xénobiotiques et de mélanges environnementaux complexes, tant en laboratoire que dans le cadre d'études de terrain (Al-Sabti et Metcalfe, 1995¹ ; Hayashi et al., 1998² ; Bolognesi et Fenech, 2012³).

3. Parmi les types de dommages génotoxiques qui pourraient participer à la formation de micronoyaux figurent :

- a) les cassures de brins d'ADN non réparables induites par des agents génotoxiques environnementaux et endogènes qui peuvent donner lieu à des fragments acentriques de chromosomes ;
- b) les produits d'interactions avec des protéines kinétochores, des centromères et l'appareil mitotique qui pourraient donner lieu à une répartition chromosomique inégale ou à la perte d'un chromosome complet au cours de l'anaphase.

4. D'après certaines études, la fréquence relative des micronoyaux donne une indication sur les dommages génétiques accumulés pendant la durée de vie des cellules, y compris pendant de courtes périodes de contamination. Ces observations suggèrent que ce test est adapté à la surveillance de l'ampleur des dommages génotoxiques chez les organismes marins de manière intégrée dans le temps. Il a été prouvé que les poissons répondent aux agents toxiques de manière semblable à de plus grands

¹ Al-Sabti, K., Metcalfe, C.D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat. Res.* 343, 121-135.

² Hayashi, M., Ueda, T., Uyeno, K. et al., 1998. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutat. Res.* 399, 125-133.

³ Bolognesi, C., Fenech, M., 2012. Mussel micronucleus cytome assay, *Nat. Protoc.* 17, 1125-1137.

vertébrés et peuvent être utilisés comme bioindicateurs pour surveiller les effets génotoxiques de substances qui pourraient également être dangereuses pour les humains (Al-Sabti et Metcalfe, 1995 ; Barsiene et al., 2004⁴ ; Bolognesi et Hayashi, 2011⁵ ; Bolognesi et Cirillo, 2014⁶). Le test MN, étant donné qu'il peut être appliqué à toute population cellulaire proliférative, peu importe le caryotype, a été appliqué avec succès pour de nombreuses espèces de poissons qui sont souvent caractérisées par une faible quantité d'ADN par cellule, par un grand nombre de chromosomes de petite taille et par une faible activité mitotique.

5. Différents types de cellules de poisson ont été envisagés pour l'analyse MN : cellules branchiales, de nageoire, de rein, hépatiques et érythrocytes périphériques. Toutefois, la complexité du protocole pour l'isolation des cellules branchiales, de nageoire, de rein et de foie implique de tuer les animaux et limite dès lors son application dans le cadre de la surveillance environnementale. Les érythrocytes nucléés sont les cellules les plus largement utilisées dans le test MN pratiqué sur des poissons. Le test MN sur érythrocytes a été validé par un certain nombre d'études en laboratoire et sur le terrain.

6. Une augmentation de la fréquence MN en lien avec la relation dose-réponse a été observée après exposition à des radiations ionisantes et à un grand nombre de polluants génotoxiques comme les aflatoxines, les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les hydrocarbures chlorés, les métaux lourds et les pesticides. Le recours à des colorations fluorescentes qui réagissent à l'ADN est particulièrement utile pour détecter des micronoyaux de petite taille. Différents types d'altération du noyau ont également été observés dans les érythrocytes de poissons comme des noyaux bourgeonnants, des « broken eggs », des noyaux plurilobés, dentelés, vacuolaires et une caryolyse du noyau. Les mécanismes responsables des altérations du noyau ne sont pas encore totalement connus. Il est considéré que certains d'entre eux, à l'instar des noyaux bourgeonnants, sont des indicateurs de dommage génotoxique et peuvent ainsi compléter le comptage des MN dans les études de la génotoxicité habituelles. D'autres altérations du noyau comme les noyaux plurilobés et dentelés sont principalement associées à la cytotoxicité et il convient de les enregistrer séparément (Bolognesi et Hayashi, 2011).

7. Chez les mollusques, le test MN a été utilisé sur plusieurs espèces bivalves, dans des conditions de laboratoire comme sur le terrain : les hémocytes et les cellules branchiales sont les cibles les plus courantes. Le processus de validation du test MN sur le genre *Mytilus* a débuté en 1987 (Majone et al., 1987⁷). L'induction liée à la dose de micronoyaux par différents polluants a été signalée chez des moules exposées dans des conditions de laboratoire et lors d'études de terrain (Barsiene et al., 2006⁸ ; Bolognesi et Hayashi, 2011 ; Bolognesi et Fenech, 2012).

8. Dans la grande majorité des études, seule la fréquence MN a été évaluée. Plus récemment, une étude a révélé que les résultats relatifs à la fréquence d'autres paramètres inclus dans l'approche cytomique, comme les anomalies nucléaires ou d'autres types de cellules, étaient associés aux concentrations de polluants (Bolognesi et Fenech, 2012). Il est nécessaire d'effectuer des études complémentaires et de continuer à collecter des données en utilisant les protocoles expérimentaux et des critères d'évaluation normalisés pour repérer les différents types d'anomalies cellulaires et nucléaires afin de déterminer le rôle de ces biomarqueurs dans la biosurveillance environnementale.

9. Comme mentionné ci-dessus dans le cadre de la présente note technique, les lignes directrices de surveillance pour l'analyse des biomarqueurs chez les mollusques marins (tels que *Mytilus* sp.) et les poissons (tels que *Mullus barbatus*) pour l'indicateur commun 18 de l'IMAP contiennent les deux protocoles suivants : i) protocole pour l'analyse de la fréquence des micronoyaux (MN) dans les cellules sanguines de poisson (*Mullus barbatus*) et l'évaluation et l'interprétation des résultats ; et ii)

⁴ Barsiene, J., Lazutka, S., Syvokiene, J., Dedonyte, V., Rybakovas, A., Bagdonas, E., Biornstad, A., Andersen, O.K., 2004. Analysis of micronuclei in blue mussels and fish from Baltic and North Seas. *Environ. Toxicol.* 19, 365-371.

⁵ Bolognesi, C., Hayashi, M., 2011. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis* 26, 205-213.

⁶ Bolognesi, C., Cirillo, S., 2014. Genotoxicity biomarkers in aquatic bioindicators. *Zoology* 60, 273-284.

⁷ Majone, F., Brunetti, R., Gola, I., Levis, A.G., 1987. Persistence of micronuclei in the marine mussel, *Mytilus galloprovincialis*, after treatment with mitomycin C. *Mutat. Res.* 191, 157-161.

⁸ Barsiene, J., Schiedek, D., Rybakovas, A., Syvokiene, J., Kopecka, J., Forlin, L., 2006. Cytogenetic and cytotoxic effects in gill cells of the blue mussel *Mytilus* spp. from different zones of the Baltic Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 53, 469-478.

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.

2.1 Protocole pour l'analyse de la fréquence des micronoyaux (MN) dans les cellules sanguines de poissons et l'évaluation et l'interprétation des résultats

a. Matériel

10. L'application de ce protocole nécessite le matériel suivant : poires de pipette Pasteur en caoutchouc ; boîtes de pétri ; pipette à volume réglable, 20-200 µl et 200-1000 µl ; pointes de pipette, 20-200 µl et 200-1000 µl ; seringue à usage unique, Luer Lock, 10-20 ml ; seringue à usage unique, 5 ml ; pipettes sérologiques jetables en plastique Stripette Corning, 5 ml ; pipettes Pasteur en verre, 150 mm ; lames de microscope préparées/prêtes à l'emploi Menzel-Gläser, Superfrost, 76x26 mm, 1 mm d'épaisseur, nettoyées à l'éthanol et préalablement séchées avant emploi ; lamelles couvre-objet Menzel-Gläser, n° 1 (0;13 - 0,16 mm), 60x24 mm ; cuve à coloration en verre de Coplin pour 10 lames ; cuve à coloration en verre pour lames de microscope ; porte-lames pour la coloration ; boîtes de rangements pour lames de microscope.

b. Équipement

11. L'équipement requis pour l'analyse comprend : microscope équipé d'une optique de bonne qualité pour l'examen en champ clair de lames colorées avec un grossissement x1000 ; microscope à fluorescence muni d'un oculaire x10 et d'un objectif x100, grossissement final x1 000.

c. Produits chimiques et solutions

12. Pour l'analyse de la fréquence des micronoyaux (MN) dans les cellules sanguines de poissons (*Mullus barbatus*) et pour l'évaluation et l'interprétation des résultats, les produits chimiques et solutions suivants sont utilisés : héparine de sodium ; méthanol, alcool méthylique, absolu, teneur : 99,8 % ; solution Azur-éosine-bleu de méthylène selon Giemsa en solution (Sigma Aldrich, 1.09204) ; milieu de montage Eukitt à durcissement rapide pour microscopie, ou milieu de montage DPX pour histologie ; DAPI (4',6-Diamidino-2-Phénylindole, Dilactate) ; Mowiol 4-88, glycérol, Tris.

13. La procédure de coloration au Giemsa suit la procédure décrite ci-après (Bolognesi et Fenech, 2012) :

- solution tampon concentrée de Sørensen pH 6,8 : préparer deux solutions (sol. A et sol. B) ;
- sol. A : 9,073 g/l de phosphate monopotassique dihydraté (KH₂PO₄) [CAS n° : 7778-770] ;
- sol. B : 11,87 g/l de monohydrogénophosphate de sodium dihydraté (Na₂HPO₄ 2H₂O) [CAS n° : 100028-24-7] ;
- pour obtenir 100 ml de solution tampon de Sørensen pH 6,8, mélanger 53,4 ml de la solution A avec 46,6 ml de la solution B. La solution finale (A+B) est utilisée pour préparer la solution de coloration de Giemsa et la solution de rinçage ;
- filtrer 50 ml de solution Azur-éosine-bleu de méthylène selon Giemsa en solution avec un papier filtre. Protéger de la lumière ;
- préparer 200 ml de solution de coloration de Giemsa (3 % vol/vol) en ajoutant 6 ml de Giemsa filtré et 6 ml de tampon Sørensen à 188 ml d'eau distillée et verser dans une cuve de coloration de lames.

14. La préparation du milieu de montage Mowiol suit la procédure décrite ci-après :

- ajouter 6 g de glycérol et 2,4 g de Mowiol 4-88 dans un tube de 50 ml ;
- ajouter 6 ml d'eau distillée, mélanger et laisser reposer pendant 2 heures ;
- ajouter 12 ml de solution tampon 0,2 M Tris (pH 8,5) ;
- faire incuber le tube dans l'eau chaude (50-55 °C) pendant 10 minutes et mélanger occasionnellement pour permettre la dilution du Mowiol (il est possible de répéter l'opération sur plusieurs heures si nécessaire) ;
- centrifuger la solution à 5000 g pendant 15 minutes afin d'éliminer toute particule solide non dissoute ;

- stocker une partie aliquote de 1-2 ml du milieu de montage Mowiol dans des tubes de microcentrifugation à -20 °C ;
- à 4 °C, la solution est stable pendant 1 mois ;
- laisser les lames couvertes par les lamelles dans le noir pendant la nuit afin qu'elles durcissent avant l'analyse. Après la préparation de la lame, cette solution durcit normalement pendant la nuit et il n'est pas nécessaire de sceller les lamelles avec du vernis à ongles⁹.

d. Évaluation pratique

15. La méthode de collecte des cellules sanguines et de préparation des lames est prévue dans le protocole pour la dissection et le stockage des échantillons de tissus de poissons marins (*Mullus barbatus*) de la note technique pour la collecte, l'échantillonnage et la conservation des échantillons de poissons marins (*Mullus barbatus*) pour l'analyse des biomarqueurs.

16. La procédure de coloration des lames comprend les étapes suivantes :

- colorer les lames fixées avec une solution de Giemsa à 10 % pendant 10 minutes ;
- rincer les lames deux fois dans une solution de rinçage (tampon Sørensen 1,5 %) ;
- laisser les lames sécher à l'air à température ambiante ;
- placer les lames sur un papier tissu pour les couvrir avec des lamelles ;
- verser deux grosses gouttes de Eukitt ou DPX (utiliser un compte-gouttes en plastique) sur les lamelles ;
- retourner les lames et les placer sur les lamelles. Laisser le milieu de montage se répandre ; retourner les lames de façon à ce que les lamelles soient au-dessus et presser délicatement les lamelles pour évacuer tout excès de milieu et toutes bulles d'air.

17. Les lames peuvent également être colorées au DAPI (300 nM dans une solution STP) pendant 2 à 3 minutes puis montées avec le milieu de montage Mowiol. Mettre deux grosses gouttes de milieu de montage Mowiol sur la lame et placer la lamelle ; presser délicatement la lamelle pour évacuer tout excès de milieu et toutes bulles d'air.

18. Les lames doivent être stockées dans une boîte à température ambiante (lames colorées au Giemsa) ou dans un réfrigérateur entre 0 et 4 °C (lames colorées au DAPI). Chaque lame doit être identifiée en indiquant les données relatives à la préparation et en lui attribuant un code qui permet de connaître les caractéristiques biométriques des moules analysées et le nom du chercheur qui a effectué l'analyse. L'ensemble des informations doit être consigné dans le registre d'analyse des biomarqueurs, dans lequel devrait également clairement figurer l'emplacement du conteneur dans le laboratoire.

e. Évaluation des résultats

19. L'examen des lames se fonde sur la procédure suivante :

- un seul observateur analyse en aveugle des lames codées et randomisées ;
- environ 5 000 érythrocytes par animal sont examinés dans les lames colorées au DAPI grâce à un microscope à fluorescence avec un grossissement x1 000 ;
- environ 5 000 érythrocytes par animal sont examinés dans les lames colorées au Giemsa grâce à un microscope optique avec un grossissement x1 000.

20. Les critères pour le comptage des micronoyaux sont les suivants :

- le diamètre du micronoyau représente 1/3-1/30 du diamètre du noyau principal ;
- les micronoyaux sont sur le même plan optique que le noyau principal ;
- les micronoyaux sont ronds ou ovales ;
- les micronoyaux ne sont pas liés ou connectés au noyau principal ;
- les micronoyaux peuvent toucher le noyau principal mais ne peuvent pas le chevaucher et les contours du micronoyau et ceux du noyau principal devraient être différenciables ;
- la structure de la chromatine est semblable à celle du noyau principal.

⁹ 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.

21. Il convient de tenir compte des anomalies nucléaires énumérées ci-après, lesquelles pourraient également être mentionnées en complément de l'évaluation des effets génotoxiques des produits chimiques environnementaux :

- noyau bourgeonnant : entités nucléaires de petite taille reliées au noyau principal ou petite protrusion du noyau ; le diamètre des noyaux bourgeonnants représente en règle générale 1/3-1/16 de celui du noyau principal ;
- « broken eggs » : entités nucléaires reliées au noyau principal ou petite protrusion du noyau dont le diamètre représente plus de la moitié de celui du noyau principal ;
- blebs nucléaires : petites évaginations de la membrane nucléaire ;
- noyaux plurilobés : grandes évaginations de la membrane nucléaire ;
- cellules binucléées.

22. À la fin de l'analyse, les résultats de l'évaluation MN doivent être consignés sur une page supplémentaire du registre d'analyse des biomarqueurs, où sont également indiqués les données de l'analyse et le nom des chercheurs concernés. Si les lames ont été analysées à l'aide d'une caméra vidéo, l'emplacement précis du fichier de l'analyse des biomarqueurs doit figurer dans le registre d'analyse des biomarqueurs ainsi que les informations relatives au réfrigérateur dans lesquelles les lames sont stockées après l'analyse. En outre, les informations suivantes devraient figurer sur la fiche d'analyse relative à l'essai micronoyau dans les cellules de poissons :

- nom de la personne qui analyse les lames ;
- numéro de code de chaque lame ;
- nombre total de l'ensemble des cellules analysées ;
- nombre de cellules analysées (poissons : > 5000)/lame) ;
- nombre de micronoyaux (MN) et de cellules micronucléées (cellules MN) pour 1 000.

23. Les données peuvent ensuite être analysées en recourant à des statistiques grâce au test U de Mann-Whitney non paramétrique (Speigel, 1961¹⁰) et comparées aux données de référence.

f. Interprétation des résultats

24. L'analyse des données bibliographiques indique que les valeurs de référence de la fréquence MN dans les cellules sanguines chez *Mullus barbatus* varient de 0,1 MN/1 000 cellules (Martinez Gomez et al., 2010) à 0,7 MN/1 000 cellules (Bolognesi et al., 2006¹¹ ; Viarengo et al., 2007b¹²). Davies et Vethaak (2012) ont suggéré une réponse de fond de < 0,32 MN/1 000 cellules et une réponse plus élevée de > 0,32 MN/1 000 cellules. Aucune valeur pour les critères d'évaluation de base (BAC) chez *M. Barbatus* ne figure dans la décision IG.23/6¹³, ce qui est lié à la rareté des données concernant les valeurs de la fréquence MN chez *M. Barbatus* échantillonnées dans différentes zones de la Méditerranée. La valeur de la fréquence MN dans les cellules sanguines de *M. Barbatus* issus de zones non polluées (contrôles) est l'un des principaux prérequis à l'application du test en biosurveillance environnementale. Comme mentionné ci-dessous (facteurs de confusion), en raison des différences de température de l'eau de mer dans les différentes zones de la Méditerranée, la quantité de MN dans les cellules des animaux de contrôle peut cependant considérablement varier. En l'absence de valeurs BAC, il convient ainsi de comparer les fréquences MN obtenues dans les études de biosurveillance avec les valeurs MN obtenues par le même laboratoire dans les contrôles.

25. Il convient que les prochains programmes de biosurveillance qui seront établis au titre de l'indicateur commun 18 de l'IMAP fournissent des données MN étalonnées issues d'animaux échantillonnés dans les différentes zones de la Méditerranée afin d'utiliser ces données pour évaluer des valeurs BAC correctes.

g. Facteurs de confusion

¹⁰ Speigel, M. R., 1961. Statistics. Schaum's Outline Series. Mc Graw-Hill Book Company, 359 p.

¹¹ Bolognesi, C., Perrone, E., Roggeri, P., Sciutto, A., 2006. Bioindicators in monitoring long term genotoxic impact of oil spill: Haven case study. Mar. Environ. Res. 62, S287-S291.

¹² Viarengo, A., Dondero, F., Pampanin, D.M., Fabbri, R., Poggi, E., Malizia, M., Bolognesi, C., Perrone, E., Gollo, E., Cossa, G.P., 2007b. A biomonitoring study assessing the residual biological effects of pollution caused by the HAVEN wreck on marine organisms in the Ligurian Sea (Italy). Arch Environ Contam Toxicol. 53, 607-616.

¹³ Decision IG.23/6 2017 Mediterranean Quality Status Report.

26. Comme il a été établi pour la LMS, les animaux présentent diverses conditions physiologiques au cours des différentes saisons (UNEP/RAMOGÉ, 1999 ; ICES, 2001 ; Moore et al., 2004¹⁴ ; Viarengo et al., 2007a¹⁵ ; Commission OSPAR, 2013). Pour cette raison, les animaux ne devraient pas être échantillonnés durant l'été et l'hiver et jamais pendant la période de frai : en effet, au cours de ces périodes, les poissons sont souvent en mauvaise santé, les processus de détoxification des polluants comme de réparation de l'ADN fonctionnent moins bien. Soulignons qu'il a été démontré que la température de l'eau a un effet direct sur l'index mitotique et sur le niveau de dommages à l'ADN et par conséquent sur la portée de l'expression MN avec différentes valeurs MN de référence pour des températures d'eau différentes (Barsiene et al., 2004). Les facteurs exogènes autres que les polluants génotoxiques, tels que les variations climatiques qui modulent l'induction des dommages génotoxiques, doivent dès lors être pris en compte dans l'analyse des données ; comme susmentionné, il est ainsi toujours nécessaire de comparer les données MN obtenues avec celles des animaux de référence échantillonnés dans des conditions environnementales similaires.

h. Communication des données

27. L'unité du test toxicologique de la fréquence MN convenu au titre de l'IC 18 de l'IMAP pour les poissons (*Mullus barbatus*) est : MN/1 000 cellules.

2.2 Protocole pour l'analyse de la fréquence des micronoyaux (MN) dans les cellules des branchies et les hémocytes de moules et l'évaluation et l'interprétation des résultats

a. Matériel

28. L'application de ce protocole nécessite le matériel suivant : tubes à centrifuger 15 ml en polypropylène, stériles, à fond conique ; tubes de microcentrifugation à bouchon à clipser, 2,0 ml ; pipettes sérologiques jetables en plastique Stripette Corning, 10 ml ; pipettes sérologiques jetables en plastique Stripette Corning, 5 ml ; pipettes Pasteur en verre, 150 mm ; poires de pipette Pasteur en caoutchouc ; boîtes de pétri ; pipette à volume réglable, 20-200 µl et 200-1 000 µl ; pointes de pipette, 20-200 µl et 200-1 000 µl ; seringue à usage unique, Luer Lock, 10-20 ml ; seringue à usage unique, 5 ml ; pinces à dissection, fine et forte ; ciseaux à dissection ; ciseaux fins, 14 cm de long ; lames et manches de scalpel ; glace et seau à glace ; porte-filtres Swinnex 25 mm ; filtres filet en nylon, NY8H, 180 µm ; filtres filet en nylon, NY80, 80 µm ; cellules de comptage (par ex. Thoma ou Burcker) ; lames de microscope préparées/prêtes à l'emploi Menzel-Gläser, Superfrost, 76 x 26 mm, 1 mm d'épaisseur, nettoyées à l'éthanol et préalablement séchées avant emploi ; lamelles couvre-objet Menzel-Gläser, n° 1 (0;13 - 0,16 mm), 60 x 24 mm ; cuve à coloration en verre de Coplin pour 10 lames ; cuve à coloration en verre pour lames de microscope ; porte-lames pour la coloration ; boîte de rangement pour lames de microscope.

b. Équipement

29. L'équipement requis pour l'analyse comprend : centrifugeuse de paillasse, capable d'atteindre des vitesses centrifuges de 1 000 xg ; agitateur rotatif pour tubes ; armoire de sécurité pour produits chimiques ; agitateur magnétique ; vortex , pompe à vide , pH-mètre , congélateur -20° C ; microscope équipé d'une optique de bonne qualité pour l'examen en champ clair de lames colorées avec un grossissement x1000 ; microscope à fluorescence muni d'un oculaire x10 et d'un objectif x100, grossissement final x1 000.

c. Produits chimiques et solutions

30. Pour l'analyse de la fréquence des micronoyaux (MN) dans les cellules des branchies et les hémocytes de moules (*Mytilus* sp.) et pour l'évaluation et l'interprétation des résultats, les produits chimiques et les solutions suivants sont utilisés : STP, P3813-10 Pak, SIGMA-Aldrich ; solution saline

¹⁴ 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.

¹⁵ 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.

équilibrée de Hanks (HBSS), sans bicarbonate de sodium et rouge de phénol, H1387, SIGMA-Aldrich ; dispase I (neutral protease, grade I), 04942086001, 10 x 2 mg (Roche) ; méthanol, alcool éthylique absolu, teneur : 99,8 % ; acide acétique glacial, puriss., teneur : 99,8-100,5 % ; solution Azur-éosine-bleu de méthylène selon Giemsa en solution (Sigma Aldrich, 1.09204) ; milieu de montage Eukitt à durcissement rapide pour microscopie, ou milieu de montage DPX pour histologie ; DAPI (4',6-Diamidino-2-Phénylindole, Dilactate). Pour préparer le milieu de montage Mowiol : Mowiol 4-88, glycérol, Tris.

31. La préparation de la solution saline équilibrée de Hanks (HBSS) 2X, pH 7,4 suit la procédure suivante (Bolognesi et Fenech, 2012) :

- préparer 1 litre de solution 2X en ajoutant le contenu de deux paquets de solution saline équilibrée de Hanks (HBSS), (SIGMA-Aldrich cat n° H-1387) à 800 ml d'eau distillée, remuer délicatement jusqu'à dilution. Ne pas chauffer. Rincer le paquet original avec une petite quantité d'eau pour éliminer toute trace de poudre ;
- ajouter 0,7 g de bicarbonate de sodium à la solution ;
- remuer jusqu'à dilution. Ajuster le pH de la solution si nécessaire (pH 7,4) tout en remuant ;
- ajouter de l'eau jusqu'à atteindre le volume final de la solution.

32. Préparer une solution de dispase (grade I, > 6 U/mg, Roche) de 0,1 mg/ml dans Hanks 2X en dissolvant 5 mg de l'enzyme lyophilisée dans 50 ml de solution Hanks 2X à température ambiante. Utiliser une solution fraîche pour chaque expérience.

33. Préparer 100 ml de fixateur en mélangeant le méthanol à l'acide acétique glacial avec un ratio 3:1. Il convient de préparer un nouveau fixateur à chaque fois et de l'utiliser à 4°C. Cette procédure devrait être effectuée dans une hotte de laboratoire bien ventilée. Préparer la solution de coloration de Giemsa et le milieu de mélange Mowiol en suivant les étapes décrites pour l'analyse MN dans les cellules de poissons¹⁶.

d. Évaluation pratique

34. La méthode de collecte de l'hémolymphe des moules est prévue dans le protocole pour la dissection et le stockage des échantillons de tissus de mollusques marins (tels que *Mytilus* sp.) de la note technique pour la collecte, le transport et l'échantillonnage des mollusques marins (tels que *Mytilus* sp.) pour l'analyse des biomarqueurs. Après avoir obtenu l'échantillon d'hémolymphe, vider l'aiguille et verser le contenu dans un tube à centrifuger. Centrifuger les suspensions cellulaires obtenues à 1 000 tpm (200 xg) pendant 5 minutes.

35. La méthode de collecte des branchies de moules est prévue dans le protocole pour la dissection et le stockage des échantillons de tissus de mollusques marins (tels que *Mytilus* sp.) de la note technique pour la collecte, le transport et l'échantillonnage des mollusques marins (tels que *Mytilus* sp.) pour l'analyse des biomarqueurs.

e. Préparation des cellules branchiales

Des porte-filtres en plastique millipore (Swinnex) ou des porte-filtres en acier inoxydable sont utilisés : des filtres en nylon (180 nm et 80 nm) ont été assemblés dans deux porte-filtres distincts qui seront successivement utilisés :

- Étape 1 : disséquer les moules (6 à 10 animaux par groupe expérimental), ôter les branchies et les placer dans un tube à essai codé/animal ;
- étape 2 : hacher les branchies. ajouter 2 ml d'enzyme dispase (0,1 mg/ml) à Hanks 2X. Laisser incuber l'enzyme pendant 10 minutes à température ambiante dans un agitateur rotatif ;
- étape 3 : ajouter 7 ml de solution Hanks 2X dans chaque tube à essai. Filtrer la suspension cellulaire obtenue en utilisant une seringue connectée à l'appareil à filtration. Collecter la suspension cellulaire filtrée dans des tubes à essai à centrifuger. Vérifier la qualité de la suspension cellulaire à l'aide d'un microscope inversé. Centrifuger les suspensions cellulaires à 1 000 tpm (228 xg) pendant 5 minutes à température ambiante.

¹⁶ Dans le cas de quelques produits chimiques, le fournisseur fournit des indications et il est fortement recommandé de les suivre à la lettre afin d'obtenir des résultats comparables. Sauf indication contraire, les réactifs doivent être de qualité analytique.

36. La procédure de préparation des lames nécessite de suivre les étapes suivantes :
- après avoir enlevé le surnageant, suspendre la pastille dans une solution fixatrice (méthanol : acide acétique = 3:1) dans un volume de 1 à 2 ml en fonction du nombre de cellules ;
 - après au moins 20 minutes, déposer les suspensions cellulaires sur des lames gelées (-20 °C). Laisser sécher les lames à température ambiante.
37. La procédure de coloration des lames est la suivante :
- plonger les lames de microscope avec les cellules fixées pendant 5 minutes à température ambiante dans des cuves à coloration de Coplin ou dans des cuves de coloration contenant une solution de Giemsa de 3 % ;
 - rincer les lames deux fois dans une solution de rinçage (tampon Sørensen 1,5 %) ;
 - laisser les lames sécher à l'air à température ambiante ;
 - placer les lames qui doivent être recouvertes d'une lamelle sur un papier tissu ;
 - verser deux grosses gouttes de Eukitt ou DPX (utiliser un compte-gouttes en plastique) sur les lamelles ;
 - retourner les lames et les placer sur les lamelles. Laisser le milieu de montage se répandre. Retourner les lames de façon à ce que les lamelles soient au-dessus et presser délicatement les lamelles pour évacuer tout excès de milieu et toutes bulles d'air.
38. Les lames peuvent également être colorées au DAPI (300 nM dans une solution STP) pendant 2 à 3 minutes puis montées avec le milieu de montage Mowiol. Mettre deux grosses gouttes de milieu de montage Mowiol sur la lame et placer la lamelle ; presser délicatement la lamelle pour évacuer tout excès de milieu et toutes bulles d'air. Les lames doivent être stockées dans une boîte à température ambiante (lames colorées au Giemsa) ou dans un réfrigérateur entre 0 et 4 °C (lames colorées au DAPI). Chaque lame doit être identifiée en indiquant les données relatives à la préparation et en lui attribuant un code qui permet de connaître les caractéristiques biométriques des moules analysées et le nom du chercheur qui a effectué l'analyse. L'ensemble des informations doit être consigné dans le registre d'analyse des biomarqueurs, dans lequel devrait également clairement figurer l'emplacement du conteneur dans le laboratoire.

f. Évaluation des résultats

39. L'examen des lames requiert l'équipement suivant : microscope optique muni d'un oculaire x10 et d'un objectif x100, grossissement final x1 000. Un seul observateur a analysé en aveugle des lames codées et randomisées. Au moins 2 000 cellules doivent être examinées pour l'évaluation des micronoyaux dans les hémocytes de moules. Les critères pour le comptage des micronoyaux sont les suivants :
- hémocytes : hémocytes dont la chromatine du noyau est répartie de façon homogène. les contours cytoplasmiques ou la membrane de la cellule devraient être intacts et clairement différenciables des contours cytoplasmiques des cellules voisines ;
 - cellules branchiales : cellules sans granulation semblables à des cellules épithéliales, dont la chromatine est répartie de façon homogène. les contours cytoplasmiques ou la membrane de la cellule devraient être intacts et clairement différenciables des contours cytoplasmiques des cellules voisines.
40. Les critères pour le comptage des micronoyaux sont les suivants :
- le diamètre du micronoyau est inférieur à 1/3 du diamètre du noyau principal ;
 - les micronoyaux sont sur le même plan optique que le noyau principal ;
 - les micronoyaux sont ronds ou ovales ;
 - les micronoyaux ne sont pas liés ou connectés au noyau principal ;
 - les micronoyaux peuvent toucher le noyau principal mais ne peuvent pas le chevaucher et les contours du micronoyaux devraient être distincts de ceux du noyau ;
 - la structure de la chromatine est semblable à celle du noyau principal.

41. À la fin de l'analyse, les résultats de l'évaluation MN doivent être consignés sur une page supplémentaire du registre d'analyse des biomarqueurs, où sont également indiqués les données de l'analyse et le nom des chercheurs concernés. Si les lames ont été analysées à l'aide d'une caméra vidéo, l'emplacement précis du fichier de l'analyse des biomarqueurs doit figurer dans le registre d'analyse des biomarqueurs ainsi que les informations relatives au réfrigérateur dans lesquelles les lames sont rangées après l'analyse.

42. En outre, les informations suivantes devraient figurer sur la fiche d'analyse relative au test micronoyau dans les cellules de moules :

- nom de la personne qui analyse les lames ;
- numéro de code de chaque lame ;
- nombre total de l'ensemble des cellules analysées ;
- nombre de cellules analysées (moules : > 2 000) ;
- nombre de micronoyaux (MN) et de cellules micronucléées (cellules MN) pour 1 000.

Les données peuvent ensuite être analysées en recourant à des statistiques grâce au test U de Mann-Whitney non paramétrique (Speigel, 1961) et comparées aux données de référence.

g. Interprétation des résultats

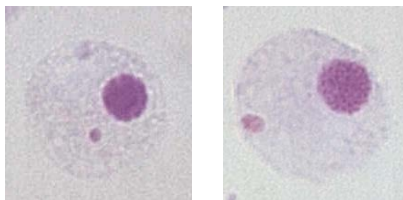
43. Même si selon la décision IG.23/6 relative au rapport 2017 sur la qualité de la Méditerranée (2017 MED QSR) et Davies et Vethaak (2012), la valeur BAC se situe à 1 MN/1 000 cellules dans les moules (*Mytilus galloprovincialis*), il convient de relever qu'une analyse étendue des données bibliographiques indique clairement que les valeurs de référence de la fréquence MN dans les hémocytes et les cellules branchiales de moules varient en fonction de la température de l'eau, allant de 0,37 MN/1 000 cellules dans une eau à 5 °C (Barsiene et al., 2004, 2006) à 6 MN/1 000 cellules dans une eau à 20 °C (Bolognesi et Fenech, 2012). La disponibilité de valeurs BAC dans les moules issues de zones non polluées (contrôle) est l'un des principaux prérequis à l'application de l'essai à la biosurveillance environnementale. En l'absence de valeurs BAC communément acceptées, il convient de comparer les fréquences MN obtenues dans les études de biosurveillance avec l'éventail de valeurs MN obtenues par le même laboratoire dans les contrôles.

44. Il convient que les prochains programmes de biosurveillance qui seront établis au titre de l'indicateur commun 18 de l'IMAP fournissent des données MN étalonnées issues d'animaux échantillonnés dans les différentes zones de la Méditerranée afin d'utiliser ces données pour évaluer des valeurs BAC correctes.

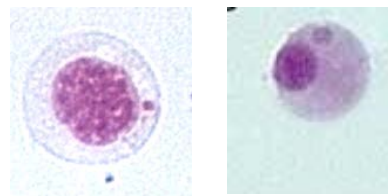
h. Facteurs de confusion

45. Il est bien établi que les animaux présentent diverses conditions physiologiques au cours des différentes saisons (PNUE/RAMOGÉ, 1999 ; ICES, 2001 ; Moore et al., 2004 ; Viarengo et al., 2007a ; Commission OSPAR, 2013). Pour cette raison, les animaux ne devraient pas être échantillonnés durant l'été et l'hiver et jamais pendant la période de frai : en effet, au cours de ces périodes les moules et les poissons sont souvent en mauvaise santé, les processus de détoxification des polluants comme de réparation de l'ADN fonctionnent moins bien. Il a été démontré que la température de l'eau a un effet direct sur l'index mitotique des cellules et par conséquent sur la portée de l'expression MN avec différentes valeurs MN de référence pour des températures d'eau différentes (Barsiene et al., 2004 ; 2006). Les facteurs exogènes autres que les polluants génotoxiques, tels que les variations climatiques qui modulent l'induction des dommages génotoxiques, doivent être pris en compte dans l'analyse des données (ICES, 2011) ; ainsi, comme susmentionné, il est toujours nécessaire de comparer les données MN obtenues avec celles des animaux de référence échantillonnés dans des conditions environnementales similaires.

A)



B)



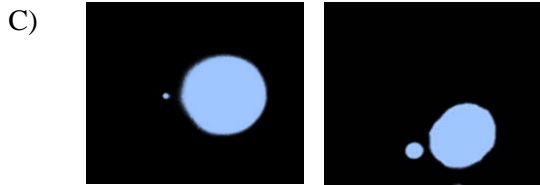


Figure 5: images de différents types de cellules de moules (*Mytilus galloprovincialis*) colorés au Giemsa à 3 %. A) cellules branchiales non ciliées sans granulation avec MN, B) hémocytes sans granulation avec MN, C) cellules branchiales sans granulation avec MN, colorées au DAPI.

46. Une série de photos des divers types de cellules, MN et anomalies nucléaires est disponible dans les publications citées dans les références (Barsiene et al., 2006 ; Bolognesi et Fenech, 2012 ; Davies et Vethaak, 2012).

i. Communication des données

47. Comme le prévoit la fiche d'orientation relative à l'indicateur commun 18 de l'IMAP, l'unité convenue pour les tests toxicologiques MN au titre de l'IC 18 de l'IMAP est le nombre de cas, le ‰ dans les hémocytes, à savoir MN/1 000 cellules dans les mollusques bivalves comme les moules.

3 Note technique pour l'analyse de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) dans les branchies de moules et le muscle de poisson

48. L'acétylcholinestérase (AChE) est l'enzyme présente dans la membrane plasmique de nombreux types de cellules chez la plupart des animaux ; elle catalyse la réaction :

Acétylcholine \longrightarrow choline + acide acétique.

49. L'activité AChE a été proposée en tant que biomarqueur d'exposition à des composants anticholinergiques comme les carbamates et les pesticides organophosphorés (OP) (Bocquené et al., 1993¹⁷ ; Escartín et Porte, 1997¹⁸ ; Bocquené et Galgani, 1998 ; Burgeot et al., 2001¹⁹ ; Galloway et al., 2002²⁰). Il a été établi que dans les tissus de vertébrés, l'activité de cette enzyme était extrêmement sensible à ces deux types de pesticides. Ces produits chimiques peuvent par conséquent affecter de nombreuses fonctions physiologiques des animaux, telles que la respiration, l'alimentation, la nage, etc. Pour ces raisons, ce biomarqueur pourrait également être considéré comme biomarqueur de stress ; en effet, l'inhibition de cette activité enzymatique pourrait altérer la capacité des animaux à s'adapter à leur environnement. Il a également été prouvé que de nombreux contaminants environnementaux comme les hydrocarbures polycycliques aromatiques (PAH), les polychlorobiphényles (PCB), les métaux, etc. pouvaient affecter l'activité AChE (Bocquené et al., 1993 ; Escartín et Porte, 1997 ; Solé et al., 2010²¹).

50. Il convient cependant de noter que la sensibilité de l'activité AChE aux carbamates et aux OP peut considérablement varier d'un organisme à l'autre. Chez les moules marines en particulier, la sensibilité de l'activité AChE aux pesticides est semblable à celles de biomarqueurs tels que la stabilité

¹⁷ Bocquené, G. Galgani, F., Burgeot, T., Le Dean, L., Truquet, P., 1993. Acetylcholinesterase levels in marine organisms along French coasts. Mar. Poll. Bull. 26, 101-106.

¹⁸ Escartín, E., Porte, C., 1997. The use of cholinesterase and carboxylesterase activities from *Mytilus galloprovincialis* in pollution monitoring. Environ. Toxicol. Chem. 16, 2090-2095.

¹⁹ Burgeot, T., Bocquené, G., His, E., Vincent, F., Geffard, O., Beira, R., et al., 2001. Monitoring of biological effects of pollutants: field application. In: Garrigues Ph., Barth, H., Walker, C.H., Narbonne, J.F., editors. Biomarkers in marine organisms: a practical approach. Amsterdam: Elsevier, pp. 179-213.

²⁰ Galloway, T.S., Millward, N., Browne, M.A., Depledge, M.H., 2002. Rapid assessment of organophosphorous/carbamate exposure in the bivalve mollusc *Mytilus edulis* using combined esterase activities as biomarkers. Aquat Toxicol. 61, 169-180.

²¹ Solé, M., Baena, M., Arnau, S., Carrasson, M., Maynou, F., Cartes, J.E., 2010. Muscular cholinesterase activities and lipid peroxidation levels as biomarkers in several Mediterranean marine fish species and their relationship with ecological variables. Environ. Int. 36, 202-211.

de la membrane lysosomale (LMS), un biomarqueur de stress reconnu (Rickwood et Galloway, 2004²²). Chez les mollusques bivalves, une diminution de l'activité AChE ne peut que fournir une indication quant à une éventuelle contamination environnementale par les pesticides et devrait à ce titre être considérée comme un biomarqueur de stress général.

51. Conformément aux idées développées ci-dessus, dans le cadre de la présente note technique, les lignes directrices de surveillance pour l'analyse de biomarqueurs chez les mollusques marins (tels que *Mytilus* sp.) et les poissons (tels que *Mullus barbatus*) pour l'indicateur commun 18 de l'IMAP prévoit le protocole pour la préparation de l'homogénéat des tissus et pour la détermination enzymatique de l'activité AChE, ainsi que pour l'évaluation et l'interprétation des résultats.

3.1 Protocole pour la préparation de l'homogénéat de tissus et pour la détermination enzymatique de l'activité AChE, ainsi que pour l'évaluation et l'interprétation des résultats

a. Principe

52. Comme indiqué dans les fiches d'orientation IMAP (UNEP/MED WG.467/5, 2019²³), la méthode d'évaluation biochimique de l'activité AChE se fonde sur la capacité de l'enzyme à utiliser un substrat spécifique d'acétylthiocholine (ACTC) :

Acétylthiocholine \longrightarrowthiocholine + acide acétique

53. La thiocholine libérée par l'activité AChE est détectée par la réaction avec l'acide 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoïque (DTNB), un réactif spécifique servant à détecter le thiol, ce qui entraîne la formation de l'acide 5-mercapto-2-nitrobenzoïque de couleur jaune absorbant à 412 nm au maximum. Cette méthode d'évaluation de l'activité AChE a initialement été décrite par Ellman et al. (1961²⁴). La méthode décrite dans le présent protocole, fondée sur Ellman et al. (1961), a été adaptée afin d'obtenir les meilleures conditions analytiques, comme l'indiquent Bocquené et Galgani (1998²⁵) et Galloway et al. (2002).

b. Matériel

54. Le matériel suivant est nécessaire pour permettre la mise en œuvre optimale du présent protocole : pipette à volume réglable, 20-200 µl et 200-1 000 µl ; pointes de pipette, 20-200 µl et 200-1 000 µl ; tubes à centrifuger 15 ml en polypropylène, stériles, à fond conique ; tubes de microcentrifugation à bouchon à clipser, 2,0 ml ; bécher en verre 100 ml, 200 ml ; cylindres gradués en verre ; cuvettes pour spectrophotomètre 1-3 ml (chemin optique 10 mm).

a. Équipement

55. L'équipement suivant est nécessaire : dispositif d'homogénéisation (un dispositif Potter pour les tissus mous comme les branchies et un dispositif Ultra Turrax pour l'homogénéisation des muscles) ; centrifugeuse réfrigérée (20 000 xg) ; spectrophotomètre UV ; glacière thermostatique ; balance (0,01 g).

b. Produits chimiques et solutions

56. Les produits chimiques et solutions nécessaires à l'application de ce protocole sont les suivants : 0,02 M de solution tampon de phosphate de sodium pH 7 (mélangé à 0,1 % Triton X-100 avant utilisation) (le tampon phosphate peut être stocké entre 0 et 4° C) ; 10 mM d'acide 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoïque (DTNB) (Sigma Aldrich, D8130) dans Tris 0,1 M pH 8 (cette solution peut être stockée entre 0 et 4° C pendant une semaine) ; 0,1 M d'iodure d'acétylthiocholine (ACTC) (Sigma

²² Rickwood, C.J., Galloway, T.S., 2004. Acetylcholinesterase inhibition as a biomarker of adverse effect. A study of *Mytilus edulis* exposed to the priority pollutant chlorfenvinphos. *Aquat Toxicol.* 67, 45-56.

²³ UNEP/MED WG.467/5, 2019. IMAP Guidance Factsheets: Update for Common Indicators 13, 14, 17, 18, 20 and 21; New proposal for Candidate Indicators 26 and 27.

²⁴ Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. Jr, Feather-Stone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 7, 88-95.

²⁵ Bocquené, G., Galgani, F. 1998. Biological effects of contaminants: Cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*, No. 22.

Aldrich, A5751) (le substrat ACTC peut être stocké à -20 °C, la solution ACTC devrait être préparée juste avant utilisation) ; réactif Bradford (Sigma Aldrich, B6916) ; BSA - albumine, sérum de bovin, fraction V, acide gras saturé (Sigma Aldrich, 126575 : dans le cas de quelques produits chimiques, le fournisseur fournit des indications et il est fortement recommandé de les suivre à la lettre afin d'obtenir des résultats comparables. Sauf indication contraire, les réactifs doivent être de qualité analytique).

c. Préparation de l'homogénat de branchies de moule

57. Les branchies sont prélevées sur des tissus frais ou congelés (1:4 W:V) en utilisant un tampon phosphate 0,02 M pH 7,0 (+ 0,1 % Triton X-100). Le tissu (de 0,1 à 1 g) est homogénéisé pendant 1 minute à l'aide d'un homogénéisateur Potter. Les extraits sont ensuite centrifugés à 10 000 xg pendant 30 minutes à 4 °C et une partie aliquote du surnageant est utilisée dans l'essai. Le liquide surnageant peut être stocké à -20 °C ou à une température inférieure (pendant 12 mois) sans perte considérable d'activité.

d. Préparation de l'homogénat de muscles de poisson

58. La procédure est identique à celle qu'il faut suivre pour les branchies de moule. Seule la première étape de la préparation de l'homogénat diffère en raison de l'utilisation d'un dispositif Ultra Turrax pour préparer l'homogénat de muscles. Si aucun mixeur n'est disponible, le tissu peut être traité avec de l'azote liquide dans un mortier en porcelaine pour le réduire en poudre avec un pilon. Une partie aliquote de la préparation de poudre de muscle est ensuite homogénéisée comme décrit ci-dessus et correctement diluée (1/5-1/10) avant d'être utilisée dans l'analyse.

e. Détermination de l'activité AChE

59. La procédure de détermination de l'activité AChE peut être résumée comme suit :

- ajouter 60 µl de 10 mM de DTNB (concentration finale de 0,5 mM) et 100 µl de surnageant (environ 200-500 µg de protéines) à un volume total de 1 200 µl de tampon phosphate 0,02 M (pH 7) ;
- après une incubation de 5 minutes pour permettre au DTNB de réagir avec les groupes sulfhydryles des acides aminés dans l'échantillon, ajouter 1,2 µl de 0,1 M ACTC (concentration finale 2,6 mM) pour déclencher la réaction enzymatique ;
- le taux de réaction enzymatique a été quantifié grâce à un spectrophotomètre (412 nm) comparativement à un essai témoin sans substrat ACTC. Pour soustraire l'hydrolyse spontanée du substrat, un deuxième essai témoin est effectué sans échantillon dans le mélange de réaction ;
- la réaction pour l'analyse de l'homogénat prend habituellement entre 1 et 5 minutes, la durée peut varier en fonction de l'activité enzymatique de l'échantillon qui peut changer selon les animaux ainsi que leur état physiologique.

f. Détermination des protéines

60. La procédure de détermination des protéines peut être résumée comme suit :

- La concentration en protéine est évaluée conformément à Bradford (1976²⁶), en suivant les indications du producteur Sigma-Aldrich (B6916). La méthode consiste à mélanger 1 part d'échantillon de protéine et 30 parts de réactif Bradford. L'échantillon peut être un témoin, une protéine standard ou un échantillon inconnu. Le témoin est un tampon d'homogénéisation ne contenant pas de protéine. La protéine standard est une concentration connue de la protéine albumine de sérum bovin (BSA - albumine, sérum bovin, fraction V, acide gras saturé) solubilisée dans le tampon d'homogénéisation, les concentrations utilisées pour la préparation des standards BSA vont de 0,025 à 0,8 mg/ml (solution stock 1 mg/ml) ;
- Le test est directement effectué dans une cuvette en ajoutant 0,05 ml d'échantillon, standard et témoin, à 1,5 ml de réactif Bradford (acclimatation à température ambiante) dans l'obscurité.

²⁶ Bradford, M M, 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

L'échantillon S10 est dilué (1:5-1:10) avec le tampon d'homogénéisation avant de procéder à l'essai ;

- les valeurs d'absorbance enregistrées pour les échantillons sont recoupées avec les valeurs standard afin d'obtenir le mg de protéine contenu dans 1 ml d'échantillon, et multiplié par le facteur de dilution (dans ce cas, 5 à 10) de manière à finalement obtenir la concentration mg/ml de protéines.

g. Évaluation des résultats

61. Les résultats de l'évaluation doivent découler de l'équation de calcul de l'activité AChE suivante :

$$\text{activité AChE (nmol min}^{-1} * \text{mg de protéine}^{-1}) = (\Delta\text{OD}_{412} \text{ min}^{-1} \text{ échantillon} - \Delta\text{OD}_{412} \text{ témoin}) * \text{V}_{\text{tot}} / 0,0136 \text{ OD} * \text{nmol}^{-1} \text{ mg de protéine.}^{27}$$

62. Quelques exemples d'évaluation des résultats figurent ci-après :

- 100 µl d'un extrait de branchies de moule donnent une activité approximative de 0,200 OD min⁻¹ ;
- la concentration en protéine de l'extrait est de 5 mg/ml (5 µg/µl) ;
- 100 µl d'extrait de branchies de moule = 100 × 5 = 500 µg = 0,5 mg ;
- l'activité AChE, exprimée en U min⁻¹ mg de protéine⁻¹, est : 0,200 OD min⁻¹ * V_{tot} 1,2 ml / 0,5 mg de protéine = 0,48 U min⁻¹ mg de protéine⁻¹ ;
- U min⁻¹ mg de protéine⁻¹ / 0,0136 (coefficient d'extinction molaire) = nmol de substrat hydrolysé min⁻¹ mg de protéine⁻¹ ;
- 0,48 U min⁻¹ mg de protéine⁻¹ / 0,0136 = 35,3 nmol de ACTC hydrolysé min⁻¹ mg de protéine⁻¹ ;
- à savoir : 1 ΔOD₄₁₂ min⁻¹ mg de protéine⁻¹ correspond à l'hydrolyse de 73,53 nmol de ACTC ;
- exprimée en nmol de substrat hydrolysé, l'activité spécifique est : 0,48 U min⁻¹ mg de protéine⁻¹ × 73,53 nmol = 35,3 nmol de ACTC hydrolysé min⁻¹ mg de protéine⁻¹.

63. À la fin de l'analyse, les résultats de l'évaluation de l'activité MN 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. Les informations concernant le congélateur à - 80 °C dans lequel les homogénats des différents échantillons sont stockés après l'analyse devraient également être enregistrées dans le registre d'analyse des biomarqueurs.

h. Interprétation des résultats

64. Les niveaux des critères d'évaluation de base (BAC) et des critères d'évaluation environnementale (EAC) pour l'activité AChE ont été proposés dans la décision IG.23/6 relative au rapport 2017 sur la qualité de la Méditerranée :

- activité AChE (nmol/min/mg de protéine) dans les branchies de moule dans les eaux françaises de la Méditerranée : BAC = 29, EAC = 20 ;
- activité AChE (nmol/min/mg de protéine) dans les branchies de moule dans les eaux espagnoles de la Méditerranée : BAC = 15, EAC = 10.

65. Jusqu'à présent, les données relatives aux activités AChE chez *M. galloprovincialis* et *M. barbatus* issues des zones de référence de la mer Méditerranée sont très limitées. Il a été proposé de définir le niveau de référence par région en utilisant les données à long terme disponibles (qui ne sont pas encore largement disponibles). Les BAC dans les branchies de moule issues des eaux espagnoles de la Méditerranée ont été calculés en utilisant des valeurs issues d'au moins deux zones de référence (sur la base de l'analyse chimique dans les tissus de moules) et d'échantillons effectués sur une période d'au moins trois ans (données soumises à la base de données MED POL) ainsi que des enregistrements de la salinité et de la température des eaux ambiantes au moment de l'échantillonnage.

²⁷ Note : OD₄₁₂ = densité optique = absorbance à une longueur d'onde de 412 nm.

Les EAC proviennent habituellement des données toxicologiques et, dans le cas présent, ils ont été calculés en enlevant 30 % aux valeurs BAC (Davis et Vathaak, 2012).

66. Les laboratoires n'utilisaient auparavant pas de protocoles communs pour la collecte et le transport des moules, pour l'échantillonnage et le stockage des tissus ; en outre, les méthodologies utilisées pour l'analyse de l'activité AChE n'étaient pas étalonnées entre les laboratoires qui fournissaient les données, et les méthodes utilisées pour calculer le contenu en protéine (voir Bradford contre Lowry) pouvaient également jouer un rôle dans la valeur finale des activités AChE. Les valeurs BAC et EAC dans les branchies de moules échantillonnées dans les zones côtières qui présentent des caractéristiques climatiques relativement similaires devraient être plus similaires, même si la partie sud-est-sud de la côte méditerranéenne espagnole est une région maritime différente de la côte méditerranéenne française. Un programme d'assurance qualité bien organisé fondé sur l'étalonnage, un protocole analytique identique (qui figure dans le présent document) et les mêmes réactifs est nécessaire pour clarifier les différences entre les résultats expérimentaux obtenus dans les organismes échantillonnés dans les diverses zones de la Méditerranée. En outre, notons qu'il peut être difficile de trouver des sites non pollués le long des côtes dans des zones caractérisées par l'agriculture extensive, facteur qu'il serait important de retenir dans l'estimation des valeurs BAC.

67. Les données enregistrées montrent clairement que pour l'activité AChE, les résultats devraient être interprétés sur la base des valeurs de l'activité enzymatique trouvées dans les moules de référence échantillonnées dans une zone côtière dont il est bien établi qu'elle est relativement peu contaminée. Les données enregistrées indiquent qu'une réduction de 30 % de la valeur obtenue dans les animaux de contrôle peut représenter une valeur EAC correcte. Il est important de souligner que l'utilisation de moules élevées dans des cages, issues de la mytiliculture, limite en général ce problème et facilite l'interprétation des résultats.

68. Même si les présents critères d'évaluation ne fournissent pas de valeurs de l'activité AChE dans les poissons, il est utile de mentionner les valeurs de l'activité AChE dans les muscles de *M. barbatus* comme proposé par Davies et Vethaak (2012) à partir des données analytiques de Burgeot et al. (1996²⁹) : BAC = 155 nmol/min/mg de protéine et EAC = 109 nmol/min/mg de protéine. Cependant, Solé et al. (2010) ont fait état d'une valeur AChE de 53,5 nmol/min/mg de protéine pour le site non pollué de Besòs (Espagne). Étant donné que ni la décision 22/7 sur l'IMAP ni la décision IG.23/6 relative au rapport 2017 sur la qualité de la Méditerranée ne contiennent de valeurs BAC et EAC pour *Mullus barbatus*, le PNUE/MAP considérera ces valeurs dans le cadre de prochains travaux qui seront entrepris pour améliorer ces critères d'évaluation.

69. Comme susmentionné, ici aussi dans le cas de *M. barbatus*, le problème des différences entre les résultats analytiques AChE pourrait être clarifié dans le cadre des activités d'assurance qualité (Viarengo et al., 2000³⁰). Les résultats de l'activité AChE pourraient en outre être interprétés sur la base des valeurs obtenues dans les poissons de référence échantillonnés dans une zone dont il est bien établi qu'elle est relativement peu polluée. Une réduction de 30 % de la valeur obtenue dans les animaux de contrôle peut représenter une valeur EAC correcte.

i. Facteurs de confusion

70. Les animaux présentent divers statuts physiologiques au cours des différentes saisons (PNUE/RAMOGÉ, 1999 ; ICES, 2001 ; Moore et al., 2004 ; Viarengo et al., 2007a ; Commission OSPAR, 2013). Pour cette raison, les animaux ne devraient pas être échantillonnés durant l'été et l'hiver et jamais pendant la période de frai. En ce qui concerne les autres activités enzymatiques, les changements climatiques, et notamment les valeurs de la température de l'eau, peuvent affecter le niveau d'activité AChE (Hogan, 1970³¹).

²⁹ Burgeot, T., Bocquené, G., Porte, C., Pffol Leszkowicz, A., Santella, R.M., Raoux, C., Dimeet, J., et al. 1996. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern part of the Mediterranean Sea. Mar. Ecol. Prog. Ser. 131, 125-141.

³⁰ 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.

³¹ Hogan, J.W., 1970. Water temperature as a source of variation in specific activity of brain acetylcholinesterase of bluegills. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 5, 347-353.

71. Le niveau d'activité AChE peut varier entre les poissons juvéniles et adultes ; il convient dès lors de faire particulièrement attention à utiliser des animaux dont les caractéristiques biométriques sont similaires, indiquant que les poissons ont un âge similaire (Galgani et al., 1992³²). Chez *Mytilus edulis* de la mer Baltique, les valeurs AChE varient sur deux plans selon la saison d'échantillonnage, en fonction des changements de température (Leiniö et Lehtonen, 2005³³).

72. Il a été trouvé que l'activité AChE est affectée par les toxines algales (Dailianis et al., 2003³⁴ ; Kankaanpää et al., 2007³⁵). Il est ainsi suggéré de faire figurer dans le registre d'analyse des biomarqueurs les informations concernant la présence d'une efflorescence algale au moment de la collecte des animaux.

j. Communication des données

73. Comme le prévoit la fiche d'orientation relative à l'indicateur commun 18 de l'IMAP, l'unité pour la mesure de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) dans les mollusques bivalves (comme *Mytilus* sp) ou les poissons (*M. barbatus*) est : nmol/min/mg de protéine.

4 Note technique pour l'analyse du « Stress on stress » (SoS) dans les moules

74. Le biomarqueur repose sur la définition de « stress » : le stress est une altération mesurable de la physiologie d'un organisme induite par un changement environnemental qui entraîne une diminution de la capacité de l'individu à s'adapter à d'autres variations environnementales (Bayne, 1986³⁶). D'un point de vue pratique, ce concept était appliqué aux moules en superposant une exposition à l'air, facteur de stress naturel, aux effets néfastes d'une contamination aux produits chimiques dans leur environnement. Les moules marines sont souvent naturellement exposées à l'air (Bayne, 2009³⁷) pendant de brèves périodes (heures) mais peuvent également survivre hors de l'eau pendant des jours. Elles sont capables de résister à des périodes prolongées hors de l'eau grâce à leur capacité à limiter la perte d'eau en fermant leur valve (coquille) ; et la contraction musculaire requise à cet effet repose sur un changement du métabolisme de l'énergie qui passe d'aérobie à anaérobie, phénomène typique de ces organismes (De Zwaan et Zandee, 1972³⁸ ; Bayne, 2009). Les produits chimiques toxiques, en altérant les fonctions cellulaires et en augmentant l'énergie nécessaire aux mécanismes de détoxification, ou en ayant des conséquences directes sur le métabolisme énergétique, peuvent diminuer la disponibilité de l'adénosine triphosphorique (ATP) pour remplir les fonctions physiologiques de base, et notamment la contraction musculaire, ce qui entraîne la mort de l'animal en peu de temps.

75. De nombreuses études expérimentales ont confirmé que, chez l'animal, ce biomarqueur est adapté pour détecter les effets de faibles concentrations de contaminants dans l'eau. Il a notamment été démontré que des contaminants inorganiques comme les métaux lourds (Cu et Cd) ou des composants aromatiques organiques comme 9,10-diméthyl-1,2-benzanthracène (DMBA) et PCB (Aroclor 1254) et des concentrations submicromolaires de produits organo-chimiques affectent la réaction SoS dans les moules selon la dose, et que l'effet toxique augmente considérablement dans les mollusques exposés à des mélanges chimiques (Eertman et al., 1993³⁹ ; Viarengo et al., 1995⁴⁰ ; Marcheselli et al., 2011⁴¹).

³² Galgani F., Bocquené G., Cadiou, Y., 1992. Evidence of variation in cholinesterase activity in fish along a pollution gradient in the North Sea. Mar. ecol. Prog. Ser. 91, 1–3).

³³ Leiniö, S. and Lehtonen, K. K. 2005. Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea. Comp. Biochem. Physiol. C 140, 408–421.

³⁴ Dailianis, S., Domouhtsidou, G.P., Raftopoulou, E., Kaloyianni, M., Dimitriadis, V.K., 2003. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. Marine Environmental Research 56, 443–470.

³⁵ Kankaanpää, H., Leiniö, S., Olin, M., Sjövall, O., Meriluoto, J., Lehtonen, K. K., 2007. Accumulation and depuration of cyanobacterial toxin nodularin and biomarker responses in the mussel *Mytilus edulis*. Chemosphere 68, 1210–1217.

³⁶ Bayne, B.L., 1986. In: The Role of the Oceans as a Waste Disposal Option, ed. G. Kulleberg. Riedel, NY, pp. 617-634.

³⁷ Bayne, B.L., 2009. Marine Mussels: Their Ecology and Physiology. Cambridge University Press 528 p.

³⁸ De Zwaan, A., Zandee D.I., 1972. The utilization of glycogen and accumulation of some intermediates during anaerobiosis in *Mytilus edulis* L. Comp. Biochem. Physiol. Part B 43, 47-54.

³⁹ Eertman, R.H.M., Wagenvoort, A.J., Hummel, H., Smaal, A. C., 1993. "Survival in air" of the blue mussel *Mytilus edulis* L. as a sensitive response to pollution-induced environmental stress. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 170, 179-195.

⁴⁰ Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Mancinelli, G., Accomando, R., Smaal, A.C., Orunesu, M., 1995. Stress on Stress Response: A Simple Monitoring Tool in the Assessment of a General Stress Syndrome in Mussels. Mar Environ Res 39, 245-248.

⁴¹ Marcheselli, M., Azzoni, P., Mauri, M., 2011. Novel antifouling agent-zinc pyrithione: Stress induction and genotoxicity to the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. Aquat. Toxicol. 102, 39-47.

76. Il convient de noter que les PAH, l'un des groupes de contaminants environnementaux les plus omniprésents, peuvent affecter le SoS dans les moules (*Mytilus trossulus*) échantillonnées dans les zones contaminées étudiées (Thomas et al., 1999⁴²). Ces conclusions confirment l'applicabilité générale de ce biomarqueur de stress en ce qu'il est sensible à diverses catégories de polluants dans un laboratoire ainsi que sur le terrain. Même s'il a été prouvé que d'autres biomarqueurs comme la LMS ou l'allocation énergétique à la croissance et à la reproduction (AECR) sont plus sensibles, notons que la méthodologie d'évaluation du SoS est très simple, ne coûte pas cher et ne requiert pas d'équipements onéreux. En outre, ce biomarqueur a une relation dose-réponse claire et présente une tendance décroissante caractéristique qui se prête à une interprétation toxicologique facile ; bien que des certains effets hormétiques à des concentrations minimales de substances toxiques aient été rapportés par Eertman et al. (1995⁴³).

77. Conformément aux idées développées ci-dessus, dans le cadre de la présente note technique, les lignes directrices de surveillance pour l'analyse de biomarqueurs chez les mollusques marins (tels que *Mytilus* sp.) et des poissons (tels que *Mullus barbatus*) pour l'indicateur commun 18 de l'IMAP prévoit le protocole pour l'évaluation du SoS et l'interprétation des résultats.

4.1 Protocole pour l'évaluation du SoS et l'interprétation des résultats

a. Équipement

78. L'équipement suivant est nécessaire à l'application optimale du présent protocole : sac thermostatique ; aquarium ou laboratoire ou chambre d'incubation qui permette de contrôler la température.

b. Échantillonnage sur le terrain

79. Il peut s'agir de moules élevées en cage pendant 30 jours dans les différents sites étudiés ou collectées dans des populations sauvages ; dans les deux cas, les animaux échantillonnés devraient être immergés et leur coquille devrait mesurer entre 4 et 5 cm. Il convient de souligner que, dans le cas des animaux sauvages échantillonnés dans plusieurs zones, la taille du mollusque doit être similaire. Il est nécessaire de tenir compte du fait que les animaux plus jeunes (moules plus petites) survivent plus longtemps hors de l'eau. En outre, pendant la procédure d'échantillonnage, la température de l'eau, la salinité et l'oxygène dissous sur le site d'échantillonnage devraient être enregistrés. Pendant la collecte des moules, les byssus doivent être coupés à l'aide de ciseaux afin de diminuer les blessures infligées à l'animal.

Certaines informations supplémentaires peuvent être utiles dans le cas des moules sauvages, comme l'évaluation du coefficient de condition (Crosby et Gale, 1990⁴⁴ ; Mann, 1992⁴⁵) et le degré de maturation de la gonade (Bayne, 2009). En règle générale, les moules devraient être échantillonnées en dehors de la période de frai : juste après le frai, les animaux sont stressés et survivent moins longtemps hors de l'eau.

80. Les moules échantillonnées devraient être transférées rapidement dans une boîte isotherme tapissée de tissus de coton imbibés d'eau de mer afin de maintenir un niveau d'humidité approprié. Il importe de maintenir une température d'environ 4 °C en utilisant des blocs réfrigérants dans la boîte.

c. Détermination du SoS

81. Expérience d'exposition à l'air : En laboratoire, au moins 10 x 4 animaux de chaque site ont été soumis à une anoxie par exposition à l'air à 18 °C dans des chambres humidifiées. Les moules sont placées sur un papier filtre humidifié pour garantir le niveau d'humidité souhaité (le facteur de stress supplémentaire devrait être l'exposition à l'air et non le fait que les animaux perdent de l'eau). Le taux

⁴²Thomas, R.E., Harris, P.M., Rice, S.D., 1999. Survival in air of *Mytilus trossulus* following long-term exposure to spilled Exxon Valdez crude oil in Prince William sound. Comp. Biochem. Physiol. Part C 122, 147-152.

⁴³Eertman, R.H.M., Groenink, C.L.F.M.G., Sandee, B., Hummel, H., 1995. Response of the blue mussel *Mytilus edulis* L. following exposure to PAHs or contaminated sediments. Mar. Environ. Res. 39, 169-173.

⁴⁴Crosby, M.P., Gale, L.D., 1990. A Review and Evaluation of Bivalve Condition Index Methodologies with a Suggested Standard Method. J. Shellfish Res. 9, 233-237.

⁴⁵Mann, R., 1992. A comparison of methods for calculating condition index in eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791). VIMS Articles. 720.

de survie est évalué quotidiennement. Il a été estimé que la mort était indiquée par des symptômes tels que l'ouverture des valves et l'absence d'activité musculaire (presser la valve ouverte ne permet pas sa fermeture). L'enregistrement des animaux morts se poursuit jusqu'à ce que la mortalité atteigne 100 %.

d. Évaluation des résultats

82. Le tableau ci-dessous montre une feuille d'enregistrement de la mortalité caractéristique pour chaque 10 animaux exposés à l'air pour l'évaluation du LT₅₀ (LT = temps léthal ; LT₅₀ = nombre de jours nécessaires à l'observation de 50 % de mortalité).

SoS : date de l'expérience (xx/yy/zz), Site, Code du site, Date de l'échantillonnage

Données environnementales : Salinité de l'eau (‰), Température (°C), pH, O₂ (mg/l).

Date	Jour	Morte	Vivante	% vivante
xx/yy/zz	0	0	10	100
xx/yy/zz	1	0	10	100
xx/yy/zz	2	1	9	90
xx/yy/zz	3	0	9	90
xx/yy/zz	etc.	etc.	etc.	etc.
xx/yy/zz	16	10	0	0

83. Analyse des données

Les valeurs LT₅₀ sont utilisées pour évaluer les différences statistiques entre les contrôles et les animaux des sites dont les niveaux de pollution diffèrent. Les courbes de survie et les valeurs LT₅₀ peuvent être estimées grâce à la méthode Kaplan-Meier (Kaplan et Meier, 1958⁴⁶) et au test Spearman-Kärber (Hamilton et al., 1977⁴⁷). À la fin de l'analyse, les résultats de l'évaluation de l'activité MN doivent être consignés sur une page supplémentaire du registre d'analyse des biomarqueurs, en indiquant également les données de l'analyse et le nom des chercheurs concernés.

e. Interprétation des résultats

84. La proposition de la valeur BAC du SoS est également conforme aux données enregistrées dans l'objet ICES n°59 (Thain et al., 2019) où les données expérimentales rapportées font état de valeurs de contrôle SoS situées à environ 7,5 jours. Ces différences entre les données issues des articles scientifiques soulignent l'importance de l'activité d'étalonnage dans le cadre du programme d'assistance qualité afin d'établir des valeurs BAC et EAC correctes pour la mer Méditerranée. La bonne stratégie est ainsi de comparer les données de terrain avec les résultats SoS obtenus dans les moules échantillonnées dans une zone côtière de référence.

85. Les indications concernant l'interprétation des données liées du SoS rapportées dans la décision IG. 23/6 relative au rapport 2017 sur la qualité de la Méditerranée basée sur l'objet ICES n°59 (Thain et al., 2019⁴⁸) sont : LT50 (jours) : BAC = 11, EAC = 5. Si les valeurs SoS sont supérieures à 10 jours, les mollusques sont sains ; entre 5 et 10 jours, ils sont stressés ; si elles sont inférieures à 5 jours, les moules présentent un haut niveau de stress et sont dans une situation pathologique. L'analyse des données établies par différents auteurs comme Smaal et al. 1991⁴⁹ et

⁴⁶ Kaplan, E. L., Meier, P., 1958. Nonparametric estimation from incomplete observations. J. Am. Stat. Ass. 53, 457-481.

⁴⁷ Hamilton, M.A., Russo, R.C., Thuston, R.V., 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11, 714-719.

⁴⁸ Thain, J., Fernández, B., Martínez-Gómez, C., 2019. Biological effects of contaminants : Stress on stress (SoS) response in mussels. ICES Techniques in Marine Environmental Sciences. No. 59. 11 pp.

⁴⁹ Smaal A.C., Wagenvoort, A., Hemelraad, J., Akkerman, I., 1991. Response to stress of mussels (*Mytilus edulis*) exposed in Dutch tidal waters. Comp. Biochem. Physiol. C. 100, 197-200.

Viarengo et al. (1995) indique toutefois qu'il conviendrait d'envisager une valeur BAC plus réaliste, à l'instar d'un LT50 de 7,5 jours.

f. Facteurs de confusion

86. Les animaux présentent divers statuts physiologiques au cours des différentes saisons (PNUE/RAMOGÉ, 1999 ; ICES, 2001; Moore et al., 2004 ; Viarengo et al., 2007a ; Commission OSPAR, 2013). Pour cette raison, les animaux ne devraient pas être échantillonnés durant l'été et l'hiver et jamais pendant la période de frai : en effet, au cours de ces périodes les moules sont souvent en mauvaise santé et survivent moins longtemps hors de l'eau. Ce fait montre clairement que, lorsque cela est possible, l'utilisation de moules élevées en cage constitue la meilleure solution pour obtenir des données normalisées, plus comparables et reproductibles.

87. Notons que les animaux plus jeunes (plus petits) survivent plus longtemps hors de l'eau (Thomas et al., 1999). Enfin, la valeur de température de la chambre destinée aux expériences SoS devrait être régulièrement vérifiée : des températures plus basses dans la chambre (ainsi que la température de l'eau de mer sur le site d'échantillonnage, comme susmentionné) permettent aux mollusques de survivre plus longtemps hors de l'eau (Thomas et al., 1999).

Communication des données

88. L'unité relative au test toxicologique SoS convenu au titre de l'IC 18 pour l'IMAP dans les mollusques bivalves comme la moule est : LT₅₀ (jours).

Annexe I
Références

- Al-Sabti, K., Metcalfe, C.D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat. Res.* 343, 121-135.
- Barsiene, J., Lazutka, J., Syvokiene, J., Dedonyte, V., Rybakovas, A., Bagdonas, E., Bjornstad, A., Andersen, O.K., 2004. Analysis of micronuclei in blue mussels and fish from the Baltic and North Seas. *Environ. Toxicol.* 19, 365-371.
- Barsiene, J., Schiedek, D., Rybakovas, A., Syvokiene, J., Kopecka, J., Forlin, L., 2006. Cytogenetic and cytotoxic effects in gill cells of the blue mussel *Mytilus* spp. from different zones of the Baltic Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 53, 469-478.
- Bayne, B.L., 1986. In: *The Role of the Oceans as a Waste Disposal Option*, ed. G. Kulleberg. Riedel, NY, pp. 617-634.
- Bayne, B.L., 2009. *Marine Mussels: Their Ecology and Physiology*. Cambridge University Press 528 p.
- Bocquené, G., Galgani, F. 1998. Biological effects of contaminants: Cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*, No. 22.
- Bocquené, G., Galgani, F., Burgeot, T., Le Dean, L., Truquet, P., 1993. Acetylcholinesterase levels in marine organisms along French coasts. *Mar. Poll. Bull.* 26, 101-106.
- Bolognesi, C., Cirillo, S., 2014. Genotoxicity biomarkers in aquatic bioindicators. *Zoology* 60, 273-284.
- Bolognesi, C., Fenech, M., 2012. Mussel micronucleus cytome assay, *Nat. Protoc.* 17, 1125-1137.
- Bolognesi, C., Hayashi, M., 2011. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis* 26, 205-213.
- Bolognesi, C., Perrone, E., Roggeri, P., Sciutto, A., 2006. Bioindicators in monitoring long term genotoxic impact of oil spill: Haven case study. *Mar. Environ. Res.* 62, S287-S291.
- Bradford, M M, 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Burgeot, T., Bocquené, G., Porte, C., Pfohl Leszkowicz, A., Santella, R. M., Raoux, C., Dimeet, J., et al. 1996. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern part of the Mediterranean Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 131, 125-141.
- Burgeot, T., Bocquené, G., His, E., Vincent, F., Geffard, O., Beira, R., et al., 2001. Monitoring of biological effects of pollutants: field application. In: Garrigues Ph., Barth, H., Walker, C.H., Narbonne, J.F., editors. *Biomarkers in marine organisms: a practical approach*. Amsterdam: Elsevier, pp. 179-213.
- 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).
- Crosby, M.P., Gale, L. D., 1990. A Review and Evaluation of Bivalve Condition Index Methodologies with a Suggested Standard Method. *J. Shellfish Res.* 9, 233-237.
- Dailianis, S., Domouhtsidou, G.P., Raftopoulou, E., Kaloyianni, M., Dimitriadis, V.K., 2003. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. *Marine Environmental Research* 56, 443-470.
- 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.
- De Zwaan, A., Zandee D.I., 1972. The utilization of glycogen and accumulation of some intermediates during anaerobiosis in *Mytilus edulis* L. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 43, 47-54.

Decision IG.23/6 2017 Mediterranean Quality Status Report.

Eertman, R.H.M., Wagenvoort, A.J., Hummel, H., Smaal, A.C., 1993. "Survival in air" of the blue mussel *Mytilus edulis* L. as a sensitive response to pollution-induced environmental stress. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 170, 179-195.

Eertman, R.H.M., Groenink, C.L.F.M.G., Sandee, B., Hummel, H., 1995. Response of the blue mussel *Mytilus edulis* L. following exposure to PAHs or contaminated sediments. Mar. Environ. Res. 39, 169-173.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. Jr, Feather-Stone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol. 7, 88-95.

Escartín, E., Porte, C., 1997. The use of cholinesterase and carboxylesterase activities from *Mytilus galloprovincialis* in pollution monitoring. Environ. Toxicol. Chem. 16, 2090-2095.

Galgani F., Bocquené G., Cadiou, Y., 1992. Evidence of variation in cholinesterase activity in fish along a pollution gradient in the North Sea. Mar. ecol. Prog. Ser. 91, 1-3).

Galloway, T.S., Millward, N., Browne, M.A., Depledge, M.H., 2002. Rapid assessment of organophosphorous/carbamate exposure in the bivalve mollusc *Mytilus edulis* using combined esterase activities as biomarkers. Aquat Toxicol. 61, 169-180.

Hamilton, M.A., Russo, R.C., Thuston, R.V., 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11, 714-719.

Hayashi, M., Ueda, T., Uyeno, K. et al., 1998. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. Mutat. Res. 399, 125-133.

Hogan, J.W., 1970. Water temperature as a source of variation in specific activity of brain acetylcholinesterase of bluegills. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 5, 347-353.

Kankaanpää, H., Leiniö, S., Olin, M., Sjövall, O., Meriluoto, J., Lehtonen, K. K., 2007. Accumulation and depuration of cyanobacterial toxin nodularin and biomarker responses in the mussel *Mytilus edulis*. Chemosphere 68, 1210-1217.

Kaplan, E. L., Meier, P., 1958. Nonparametric estimation from incomplete observations. J. Am. Stat. Ass. 53, 457-481.

Leiniö, S. and Lehtonen, K. K. 2005. Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea. Comp. Biochem. Physiol. C 140, 408-421.

Majone, F., Brunetti, R., Gola, I., Levis, A.G., 1987. Persistence of micronuclei in the marine mussel, *Mytilus galloprovincialis*, after treatment with mitomycin C. Mutat. Res. 191, 157-161.

Mann, R., 1992. A comparison of methods for calculating condition index in eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791). VIMS Articles. 720.

Marcheselli, M., Azzoni, P., Mauri, M., 2011. Novel antifouling agent-zinc pyrithione: Stress induction and genotoxicity to the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. Aquat. Toxicol. 102, 39-47.

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.

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

Rickwood, C.J., Galloway, T.S., 2004. Acetylcholinesterase inhibition as a biomarker of adverse effect. A study of *Mytilus edulis* exposed to the priority pollutant chlorfenvinphos. Aquat Toxicol. 67, 45-56.

Smaal, A.C., Wagenvoort, A., Hemelraad, J., Akkerman, I., 1991. Response to stress of mussels (*Mytilus edulis*) exposed in Dutch tidal waters. Comp. Biochem. Physiol. C. 100, 197-200.

- Solé, M., Baena, M., Arnau, S., Carrasson, M., Maynou, F., Cartes, J.E., 2010. Muscular cholinesterase activities and lipid peroxidation levels as biomarkers in several Mediterranean marine fish species and their relationship with ecological variables. *Environ. Int.* 36, 202-211.
- Speigel, M.R., 1961. *Statistics*. Schaum's Outline Series. Mc Graw-Hill Book Company, 359 p.
- Thain, J., Fernández, B., Martínez-Gómez, C., 2019. Biological effects of contaminants: Stress on stress (SoS) response in mussels. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*. No. 59. 11 pp.
- Thomas, R.E., Harris, P.M., Rice, S.D., 1999. Survival in air of *Mytilus trossulus* following long-term exposure to spilled Exxon Valdez crude oil in Prince William sound. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 122, 147-152.
- UNEP/MED WG.467/5, 2019. *IMAP Guidance Factsheets: Update for Common Indicators 13, 14, 17, 18, 20 and 21; New proposal for Candidate Indicators 26 and 27*.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Mancinelli, G., Accomando, R., Smaal, A.C., Orunesu, M., 1995. Stress on Stress Response: A Simple Monitoring Tool in the Assessment of a General Stress Syndrome in Mussels. *Mar Environ Res* 39, 245-248.
- 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., 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.
- Viarengo, A., Dondero, F., Pampanin, D.M., Fabbri, R., Poggi, E., Malizia, M., Bolognesi, C., Perrone, E., Gollo, E., Cossa, G.P., 2007b. A biomonitoring study assessing the residual biological effects of pollution caused by the HAVEN wreck on marine organisms in the Ligurian Sea (Italy). *Arch Environ Contam Toxicol.* 53, 607-616.