



**HAL**  
open science

## Mise au point des conditions pratiques d'utilisation du biomarqueur EROD dans un réseau de surveillance

P. Noury, B. Migeon, Jeanne Garric, Marc Babut, Patrick Flammarion

► **To cite this version:**

P. Noury, B. Migeon, Jeanne Garric, Marc Babut, Patrick Flammarion. Mise au point des conditions pratiques d'utilisation du biomarqueur EROD dans un réseau de surveillance. pp.30, 2004. hal-02602448

**HAL Id: hal-02602448**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02602448v1>**

Submitted on 16 May 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Département Gestion des Milieux Aquatiques

Unité de Recherche Biologie des Ecosystèmes Aquatiques

Laboratoire d'Ecotoxicologie

3 bis quai Chauveau, CP 220

69366 Lyon Cedex 09

Tél. 04 72 20 87 87 - Fax 04 78 47 78 75

## Mise au point des conditions pratiques d'utilisation du biomarqueur EROD dans un réseau de surveillance

Patrice Noury, Bernard Migeon, Jeanne Garric, Marc Babut et Patrick Flammarion

## Résumé :

La mesure de variables biologiques est complémentaire des analyses chimiques pour l'évaluation de la qualité de l'eau et des milieux aquatiques.

Par exemple, l'induction de l'activité enzymatique EROD chez le poisson est liée à la présence de HAP, PCB et dioxines. Ce biomarqueur est couramment utilisé pour des évaluations ponctuelles mais une utilisation en routine et à grande échelle (bassin fluvial) a rendu indispensable l'obtention de valeurs témoins (de référence) chez des espèces sentinelles, ainsi que la quantification la plus précise possible des facteurs de variabilité tant chimiques que naturels. L'ensemble des études menées par le Cemagref en milieu dulçaquicole a permis de proposer, sur des critères statistiques, des classes d'induction de l'activité EROD pour les espèces de cyprinidés étudiées. La mesure de l'activité EROD vient d'être normalisée par l'AFNOR.

La mesure de ce biomarqueur ainsi que l'interprétation des niveaux observés ont désormais une maturité suffisante pour s'engager dans une utilisation dans des réseaux de suivi de la qualité des écosystèmes aquatiques. Ce rapport en présente les modalités pratiques.

Mots-clés : poisson, biomarqueur, EROD, réseau, classe de qualité.

CONTRAT	PROGRAMME DE RECHERCHE	DATE	DIFFUSION
MEDD-DE	EXPER (ECOTOX)	Octobre 2002	tous publics <input type="checkbox"/> interne <input type="checkbox"/> confidentielle <input checked="" type="checkbox"/>

# SOMMAIRE

1	Avant propos .....	3
2	Mesures biologiques et intérêts des biomarqueurs .....	4
3	Synthèse des connaissances sur l'EROD. ....	6
3.1	Principe de l'induction de l'activité EROD .....	6
3.2	Inducteurs ... et inhibiteurs .....	6
3.3	Facteurs de variabilité .....	8
3.4	Exemples d'utilisation <i>in situ</i> .....	8
3.5	Acquis sur des espèces de cyprinidés dulçaquicoles.....	9
4	Conseils d'échantillonnage.....	10
4.1	Plan d'échantillonnage et choix de stations .....	10
4.2	Choix des espèces.....	11
4.3	Echantillonnage des foies.....	12
5	Méthode d'analyse enzymatique et traitement des résultats.....	14
5.1	Principe et méthode de dosage.....	14

5.2	Présentation des résultats d'activités EROD .....	15
5.3	Correction éventuelle des activités EROD des femelles.....	16
5.4	Classes de « qualité EROD » .....	16
5.5	Mise en œuvre et durée des diverses étapes .....	18
6	Un exemple d'application.....	19
7	Conclusion.....	23
8	Références bibliographiques .....	24

# 1 AVANT PROPOS

La mesure de l'activité enzymatique EROD (Ethoxy Resorufine O Deethylase) dans les foies de poisson est actuellement la mesure biochimique la mieux connue et la plus aboutie comme biomarqueur de pollution en vue d'une utilisation routinière. Ce biomarqueur renseigne sur l'exposition des poissons à des polluants majeurs de l'environnement tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), polychlorobiphényles (PCBs), organochlorés, dioxines, effluents de papeterie etc.

Par ailleurs, le biomarqueur EROD satisfait aux critères exigibles pour s'intégrer dans une batterie d'indicateurs biologiques capables de détecter l'exposition des poissons à certaines familles de polluants. Les travaux menés par le Cemagref permettent de classer les réponses EROD de 1 à 5 selon l'importance de l'impact (la classe 1 correspondant à des sites de référence). D'autre part, la normalisation nationale et internationale de ce biomarqueur, encouragée par les Agences de l'Eau et la Direction de l'Eau du MEDD, est actuellement bien avancée (norme AFNOR publiée, travaux en cours dans le groupe WG2 de l'ISO TC147).

Ce guide technique vise à rendre plus commune la connaissance théorique et pratique sur ce biomarqueur. Pour cela ce document est séparé en quatre parties principales :

1. Présentation synthétique des mesures de biomarqueurs chez les poissons. Exemple de la mesure de l'induction de l'EROD.
2. Fiche technique sur l'échantillonnage (espèces, nombre, paramètres à relever, dissection, conservation ...).
3. Méthode d'analyse enzymatique (principe du dosage).
4. Interprétation des résultats et stratégie d'utilisation du biomarqueur EROD.

## 2 MESURES BIOLOGIQUES ET INTERETS DES BIOMARQUEURS

Les programmes de surveillance utilisent largement les mesures chimiques comme paramètres de qualité.

Il se trouve cependant que, aussi indispensables qu'ils soient, les diagnostics chimiques ne permettent pas de prédire directement un impact écologique, tandis que les diagnostics effectués sur les communautés de poissons ou d'invertébrés ne permettent pas facilement d'identifier les contaminants responsables des effets écologiques observés. En effet, l'analyse chimique des polluants n'est pas toujours possible du fait de la multiplicité des molécules présentes et de la sensibilité limitée des méthodes chimiques. Par ailleurs, une telle approche ne renseigne pas sur les risques encourus par les populations exposées aux polluants, et ne peut, à elle seule, prédire les effets biologiques des mélanges de contaminants (synergies...) ni quantifier simplement la biodisponibilité des polluants pour les organismes vivants. D'autre part, les bioindicateurs (invertébrés ou poissons) donnent effectivement une note objective sur l'état de santé des communautés mais leurs valeurs sont délicates à relier aux concentrations des contaminants, car ils sont intégrateurs d'une multitude de variables (dont l'hydrologie ou les modifications d'habitat). De ce fait, le gestionnaire manque d'informations sur l'urgence des mesures à prendre pour améliorer l'état de santé de ces écosystèmes, ou protéger la biodiversité et l'intégrité des écosystèmes.

En raison des difficultés logistiques des suivis de population de poissons sur le terrain, la mise en évidence d'un changement au niveau de la taille ou de la structure de la population est délicate, suppose un suivi sur plusieurs années ou décennies, et risque de ne pouvoir être démontrée avant que les effets ne soient dramatiques. Cette difficulté explique le développement de mesures de paramètres sur les individus (survie, reproduction etc.), les conséquences sur la dynamique de population étant au mieux modélisées (par exemple (Munns *et al.* 1997)).

Les biomarqueurs sont des "*indicateurs biochimiques, physiologiques ou histologiques d'exposition, ou d'effet, d'un organisme à des contaminants*" (Benson *et al.* 1992; Huggett *et al.* 1992). Une définition plus récente considère un biomarqueur comme "*un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, physiologique ou comportemental qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant*" (Lagadic *et al.* 1997). Les biomarqueurs sont donc des variables

biologiques qui sont à la fois précoces et sensibles, mais aussi aptes à fonder un diagnostic sur la qualité de l'écosystème et sur la nature et le degré de contamination. La spécificité d'un biomarqueur pour certaines familles de molécules chimiques (hydrocarbures aromatiques polycycliques, polychlorobiphényles, métaux lourds, produits phytosanitaires...) permet d'une part de révéler la présence de ces polluants, et d'autre part de renseigner sur la biodisponibilité de ces polluants ainsi que sur les effets biologiques précoces sur les organismes.

L'intérêt des biomarqueurs est donc de prévenir des dommages écologiques irréversibles sans attendre que la probabilité d'apparition de ces dégâts soit trop forte. Cependant, pour passer de la Recherche (études limitées à quelques stations) à l'Application en routine (dans un réseau de biosurveillance), il est indispensable de « calibrer » les biomarqueurs selon les critères proposés par certains auteurs (Engel *et al.* 1996; Mayer *et al.* 1992; Mc Carthy 1990) et rappelés ci-dessous :

- **mesure simple par rapport aux autres méthodes biochimiques, économique quant à l'information donnée sur les niveaux de concentrations en micropolluants et sensible à de faibles niveaux en inducteurs de l'activité EROD;**
- **variabilité aux facteurs non toxiques (organisme, environnement, méthode) bien comprise et dans des limites acceptables ; valeurs témoins en sites non contaminés ;**
- **réponse dépendant simplement de la dose et du temps et permettant une quantification de l'exposition ou de l'effet à partir de la mesure du biomarqueur ; capacité du biomarqueur à distinguer les situations polluées (pollution simple ou complexe) des situations non polluées ; expériences de laboratoire sur des espèces susceptibles d'être prélevées in situ pour quantifier les effets d'une exposition (mélange de polluants, ... ) ;**
- **signification biologique : pouvoir prédictif du biomarqueur quant à des effets à des niveaux biologiques supérieurs (reproduction...) ; éventuellement prédiction des risques pour l'homme.**

Le biomarqueur EROD est certainement un des biomarqueurs qui répond le mieux à ces critères de calibration. Nous allons le détailler dans les pages qui suivent.



## **3 SYNTHÈSE DES CONNAISSANCES SUR L'EROD.**

### **3.1 Principe de l'induction de l'activité EROD**

Suite à une contamination du milieu aquatique, les polluants peuvent pénétrer à l'intérieur des poissons et y être distribués avant de s'accumuler au niveau de différents tissus et/ou exercer leur toxicité sur l'organe cible (par exemple le foie). Cependant, des systèmes biochimiques de défense peuvent transformer ces polluants.

Les enzymes clef dans cette biotransformation sont des enzymes monooxygénases à cytochrome P450, capables d'augmenter la solubilité des polluants qui sont ensuite excrétés dans l'urine et la bile. On désigne par « induction » cette synthèse de protéines P450 par le foie. Or ces protéines sont des enzymes dont on peut suivre l'activité enzymatique par la méthode EROD qui est la plus sensible (Machala *et al.* 1997; Monod *et al.* 1988; Stegeman *et al.* 1987).

### **3.2 Inducteurs ... et inhibiteurs**

L'induction présente les deux caractéristiques suivantes : rapidité (délai de 2 à 5 jours après l'exposition) et réversibilité (de l'ordre de 1 à 2 mois). Elle est également d'autant plus élevée que les concentrations en inducteurs sont importantes. Ces inducteurs appartiennent pour la plupart aux familles chimiques suivantes (Tableau 1) : HAP (Hydrocarbures aromatiques polycycliques), PCB (Polychlorobiphényles), organochlorés (DDT, lindane...).

Tableau 1. Inducteurs du cytochrome P450 1A connus chez le poisson (d'après (Stegeman et al. 1994)).

Composé	Effet inducteur	Composé détecté dans l'environnement
betaNaphthoflavone (BNF)	+	non
3-MethylCholanthrène (3MC)	+	non
Benzo(a)Pyrène	+	oui
Benzanthracène	+	oui
Dibenzanthracène	+	oui
Dimethylbenzanthracène	+	oui
PCB77	+	oui
PCB126	+	oui
PCB169	+	oui
PCB118	+/-	oui
2,3,7,8 TCDD	+	oui
2,3,7,8 TCDF	+	oui
2,3,4,7,8 PCDF	+	oui
Isosafrole	+	non
Butoxyde de piperonyl	+	non

Cependant, des phénomènes d'inhibition peuvent intervenir, notamment en interagissant avec l'enzyme, diminuant ainsi l'activité catalytique, mais aussi en exerçant une toxicité non spécifique. Par exemple, les métaux lourds font partie de ce deuxième type d'inhibiteurs. En général l'« efficacité » de l'inhibition est moindre que celle de l'induction (Flammarion *et al.* 1998c), ce qui fait qu'elle ne « gommara » vraisemblablement pas le signal dû à l'inducteur en cas de co-occurrence d'inducteurs et d'inhibiteurs dans le milieu (Flammarion *et al.* 1996).

Tableau 2. Inhibiteurs des activités monooxygénases connus chez le poisson (d'après (Bucheli et al. 1995; Stegeman et Hahn 1994)) :

alpha-Naphtoflavone, beta-Naphtoflavone (à dose élevée), Naphtalène aminotriazole, Aminobenzotriazole, Metyrapone, Butoxyde de piperonyl, Benzo(a)Pyrène (à dose élevée), Naphtalène, Benzène, 3,3',4,4'-TCB, 3,3',4,4',5,5'-HCB, Cadmium, Tributyl étain, MS-222, SKF-525A, Phénobarbital, Acrylamide, Arsenite, Triphényl étain

### 3.3 Facteurs de variabilité

Chez les poissons exposés aux polluants chimiques, le système de biotransformation est sollicité et les activités enzymatiques de biotransformation sont induites. Mais indépendamment de toute pollution, l'EROD, comme la plupart des variables biologiques, est soumise à l'influence de nombreux autres facteurs (espèce, âge, sexe, maturation sexuelle, régime alimentaire, agents antagonistes, température) (Goksoyr *et al.* 1992) dont il faut connaître avec précision les influences afin d'interpréter correctement les niveaux du biomarqueur EROD mesurés sur des poissons prélevés dans le milieu<sup>1</sup>. Ces facteurs sont détaillés dans (Flammarion *et al.* 1998a).

Le Tableau 3 indique les ordres de grandeur de l'influence des facteurs principaux sur l'induction. Ainsi, les effets de l'espèce ou de la maturité sexuelle apparaissent en général prépondérants par rapport aux effets de la température ou de l'alimentation.

Tableau 3. Ordre de grandeur de l'influence des facteurs de modulation. (modifié d'après (Flammarion 1997))

Facteur	Ordre de grandeur de l'effet du facteur sur l'induction	Références
Espèce	50-60	(Addison <i>et al.</i> 1991; Forlin <i>et al.</i> 1993)
Maturité sexuelle des femelles	3-10	(Forlin <i>et al.</i> 1990; Larsen <i>et al.</i> 1992; Snowberger <i>et al.</i> 1991)
Alimentation	2	(Ankley <i>et al.</i> 1988; Jimenez <i>et al.</i> 1988)
Température	1-2	(Andersson <i>et al.</i> 1985; Kloepper-Sams <i>et al.</i> 1992; Sleiderink <i>et al.</i> 1995)

En facteur toutes choses égales par ailleurs. Sauf mention contraire, il s'agit de résultats de laboratoire.

### 3.4 Exemples d'utilisation *in situ*

Depuis une vingtaine d'années, la mesure de l'induction du cytochrome P450 1A, pour identifier des zones de pollutions dans l'environnement aquatique, a été largement utilisée.

<sup>1</sup> Par exemple une différence amont-aval peut être « gommée » si les poissons prélevés à l'amont sont des mâles tandis que ceux prélevés à l'aval sont des femelles (donc avec des activités réduites par rapport aux mâles).

Les premières études effectuées *in situ* datent des années 70 (Payne 1976; Payne *et al.* 1975). Un certain nombre d'études ont concerné les zones côtières (Galgani *et al.* 1991; Narbonne *et al.* 1991; Stegeman *et al.* 1987). En milieu continental, les études ont été centrées sur la caractérisation de ces systèmes enzymatiques chez des poissons issus du milieu naturel et sur l'évaluation de l'impact de certains effluents d'usines (industrie chimique, papeteries, usines d'incinération de PCBs...) (Garric *et al.* 1994; Lindstrom-Seppa *et al.* 1988; Masfaraud *et al.* 1990; Monod *et al.* 1988; Vindimian *et al.* 1991).

Les résultats de l'ensemble des études ont été repris dans des synthèses bibliographiques (Bucheli et Fent 1995; Flammarion *et al.* 1998a; White *et al.* 2000). Forte de cette expérience scientifique, la méthode est d'ores et déjà utilisée en routine à l'étranger (Etats Unis, Canada (Hodson *et al.* 1991)).

La plupart des études ont été effectuées en rivière. La majorité des références sur des études en lac concernent des expériences d'encagement de poissons (caging). Par échantillonnage, un plan d'eau peut cependant être étudié selon un gradient longitudinal (Forlin *et al.* 1992) ou en comparaison avec un autre plan d'eau de référence (Vanderroost *et al.* 1994).

### **3.5 Acquis sur des espèces de cyprinidés dulçaquicoles.**

Une série d'études menées par le Cemagref de 1995 à 2000 a permis de calibrer le biomarqueur induction de l'EROD sur trois espèces de cyprinidés, remarquables pour leur représentativité, leur abondance et leur large répartition en Europe continentale : barbeau fluviatile (*Barbus barbus*), chevaine (*Leuciscus cephalus*) et goujon (*Gobio gobio*).

Suite à ces résultats, on dispose désormais de valeurs EROD en sites peu pollués susceptibles de servir de « valeurs de référence » pour interpréter des données en sites contaminés (Flammarion *et al.* 1997). D'autre part, les deux facteurs de variabilité prépondérants (inducteurs et sexe) ont été quantifiés à la fois sur le terrain et en laboratoire pour le chevaine (Flammarion *et al.* 1998b) et le goujon (Flammarion *et al.* 1999a). Parallèlement, l'étude de la sensibilité de la mesure a été abordée en laboratoire et sur le terrain pour estimer la capacité à répondre à une succession d'événements polluants ainsi que sa réversibilité éventuelle (Flammarion *et al.* 1999a). Enfin, la transformation logarithmique des données EROD a permis d'obtenir une quantification adéquate des écarts entre groupes de poissons ainsi que cinq classes de « qualité EROD » (Flammarion *et al.* 1999b).

Nous insistons sur l'importance des « valeurs de référence ». Nous avons vu ci-dessus que l'induction de l'EROD est soumise à des facteurs de variabilité biologiques (maturité sexuelle,

espèce, etc.) dont il s'agit de connaître le plus précisément possible les influences afin de faire la part de ce qui est réellement dû à la pollution. Or, il est quasiment impossible de trouver des zones exemptes de pollution et de toute trace d'activité humaine. Seule reste faisable l'établissement de références relatives obtenues dans les sites les moins pollués possible, avec de surcroît présence des espèces retenues pour l'étude, dont il s'agirait de suivre scrupuleusement les niveaux en contaminants.

Dans la Figure 1 sont rappelées les activités EROD mesurées chez des chevaines adultes des stations de référence de 1995 à 2000. On constate la stabilité de la valeur EROD de référence mesurée chez les chevaines adultes qui est en moyenne géométrique égale à 6,8 pmol/min/mg.

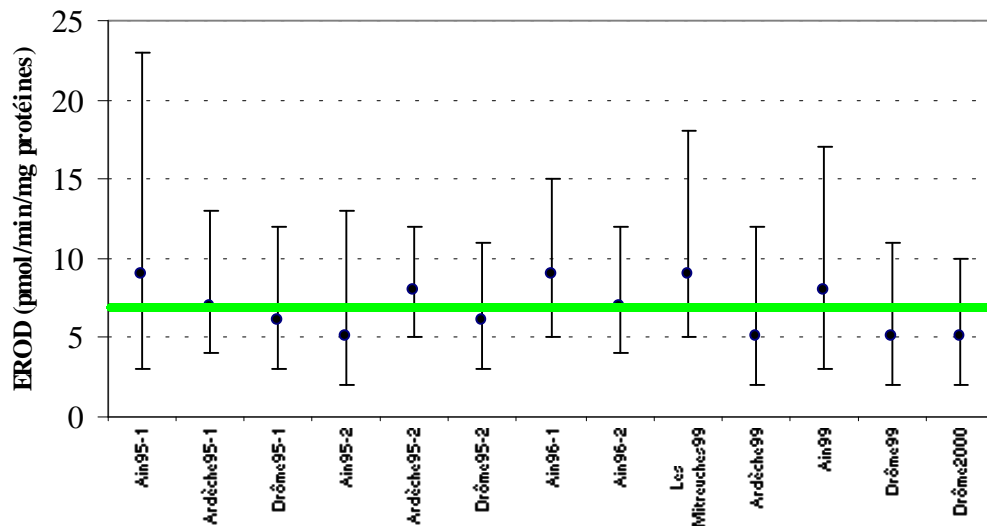


Figure 1. Activités EROD mesurées chez les chevaines en sites de référence (années 1995-2000). La ligne horizontale représente la moyenne géométrique EROD de référence (Flammarion et Garric 1997).

## 4 CONSEILS D'ECHANTILLONNAGE

### 4.1 Plan d'échantillonnage et choix de stations

Il est délicat d'avancer un diagnostic fondé sur les résultats d'un seul site. Il convient en effet de comparer ces résultats à ceux obtenus plus à l'amont ou plus à l'aval (références géographiques), ou encore par rapport à des mesures réalisées auparavant sur le même site

(références temporelles). Un réseau doit avoir une bonne couverture spatiale ainsi qu'une pérennité suffisante ; et cela tant pour donner au gestionnaire une information sur la tendance évolutive (signe de bonne gestion ou d'une dégradation) que pour permettre au scientifique de mieux comprendre le fonctionnement du système étudié.

Par exemple, l'échelle de temps compatible avec un suivi de l'EROD est de l'ordre du mois et l'échelle espace est de l'ordre de la dizaine de kilomètres (cela afin d'être cohérent avec la mobilité de certaines espèces de poissons). On peut en déduire le réseau et la fréquence correspondants. Mais compte tenu du coût d'un tel échantillonnage, il est souhaitable de différencier les points à risque (effluents à étudier spécifiquement), des points de suivi qualité (type Réseau National de Bassins). Les seconds ne nécessitent qu'un suivi annuel pour évaluer les tendances évolutives (dégradation ou restauration). Cette accumulation de données routinières permet de dégager des tendances d'évolution spatiale et temporelle de la contamination. Un suivi annuel EROD dans le cadre d'un réseau de mesure devrait être fait si possible à l'automne pour limiter l'interférence possible avec la maturation sexuelle, la mobilité des poissons lors de la fraie ; mais aussi pour faire le diagnostic après la période d'étiage estival (moins de dilution des effluents).

Une critique classique quant au prélèvement de poissons *in situ* est l'incertitude due à l'éventuelle mobilité des poissons<sup>2</sup>. D'autre part, l'échantillonnage des poissons peut poser problème (présence de l'espèce recherchée en quantité suffisante ; praticabilité pour la pêche électrique ; variabilité du débit). On fera donc particulièrement attention au choix des stations qui conditionne la facilité d'échantillonnage mais aussi la qualité de l'interprétation.

Nous proposons d'écarter l'hiver pour des raisons pratiques mais aussi en considérant la faible induction EROD en général observée à cette saison (Narbonne *et al.* 1991; Richert 1994).

## 4.2 Choix des espèces

A titre d'exemple, nous présentons dans le Tableau 4 des espèces courantes de poissons de nos rivières en les qualifiant par leur ubiquité (dans des sites pollués ou propres) mais aussi par les connaissances qui sont disponibles sur l'induction du cytochrome P450 pour ces espèces.

---

<sup>2</sup> Par exemple, si le barbeau semble présenter un degré élevé de stabilité spatiale à l'échelle annuelle (le domaine vital est de l'ordre de la dizaine de mètres), des déplacements exceptionnels de quelques kilomètres sont fréquents en période de reproduction (Baras 1992).

Tableau 4. Critères de sélection des espèces.

espèce	échantillonnage <sup>a</sup>	Connaissances P450
Barbeau	+	+
Blageon	-	-
Carpe	-	+
Chevaine	+	++
Gardon	+	+
Goujon	+	++
Hotu	+	+
Loche	+	-
Perche	-	+
Rotengle	-	-
Vairon	-	-

<sup>a</sup>Ubiquité (stations amont et aval) et efficacité de pêche.

Dans ces conditions, les espèces chevaine et goujon sont de bons candidats pour l'obtention de mesures EROD en routine. Le goujon est une espèce qui présente le double intérêt d'être benthique et d'avoir une taille compatible avec les expérimentations de laboratoire.

### 4.3 Echantillonnage des foies

Les poissons sont prélevés par pêche électrique, technique qui consiste à créer un champ électrique entre deux électrodes placées dans l'eau. Le poisson, attiré par l'anode, est alors capturé vif à l'aide d'une épuisette. Il est ensuite important de maintenir vivant les poissons en bourriche ou dans un récipient adéquat, bien oxygéné et à l'ombre.

Il n'y a pas de restriction de taille ni d'aspect dans le choix des poissons mais il est tout de même souhaitable d'éviter les poissons très jeunes (alevins) ou en mauvaise santé apparente. Par espèce étudiée, le nombre de poisson doit être au minimum de 10 individus de même sexe, mâles de préférence. A noter que cela peut parfois entraîner un effort de pêche supplémentaire à l'inventaire classiquement effectué dans le cadre d'un réseau piscicole (RHP). Pour l'espèce chevaine, la connaissance du RGS permet une correction des activités EROD des femelles qui peuvent ainsi être prise en compte au même titre que les mâles (voir paragraphe 5.3).

Les poissons choisis sont ensuite sacrifiés un à un. Un anesthésiant tel que le MS 222 (Tricaine) est déconseillé. Selon Kleinow (Kleinow *et al.* 1986) il est sans effet sur l'activité

EROD mais d'autres auteurs le prétendent inhibiteur (Tableau 2). Plus généralement on choisira d'assommer le poisson ou, pour les plus petits (par exemple les goujons), de sectionner la moelle épinière à la base de la tête avec des ciseaux.

Après pesage et mesurage, le poisson est disséqué au moyen d'instruments adéquats. Le foie est séparé des autres organes et un morceau en est découpé (environ 1g) en évitant de répandre le contenu de la vésicule biliaire qui peut contenir des inhibiteurs de l'EROD. Après rinçage dans une solution de KCl, l'échantillon est homogénéisé dans un tampon phosphate (+glycérol) au moyen d'un broyeur de Potter. L'homogénat, conditionné en tube cryogénique, est immédiatement conservé dans de l'azote liquide.

Pour chaque individu il est important d'identifier le sexe, de prélever les gonades et de les peser en vue du calcul du RGS. Pour la plupart des espèces dulçaquicoles, il n'existe pas de dimorphisme sexuel sur la base de la morphologie (hormis parfois des boutons nuptiaux chez les mâles). Pour la détermination du sexe, la dissection est donc incontournable. Le Rapport Gonado-Somatique ( $RGS = \text{poids des gonades} / \text{poids total} \times 100$ ) nous permet alors d'estimer l'état de maturité globale des poissons (Kestemont 1989).

L'identification du sexe pouvant poser parfois quelques difficultés, voici des indications concernant l'espèce chevaine :

*Les gonades femelles de chevaine* : En période de reproduction elles sont identifiables par leur masse importante leur aspect nettement granuleux et leur couleur jaunâtre. Hors période de reproduction, elles sont plus effilées, leur masse reste en moyenne un peu supérieure à celle des mâles, l'aspect demeure granuleux, et la couleur est plutôt grise. On y aperçoit généralement l'irrigation sanguine avec notamment un vaisseau longitudinal. Chez les jeunes femelles (< 15 cm) l'aspect granuleux n'est pas visible et la différenciation avec les mâles peut être délicate. On note cependant qu'une gonade femelle possède une section plutôt arrondie alors qu'une gonade mâle présente une section anguleuse. En cas de doute, une observation d'un échantillon de gonade à la loupe binoculaire entre lame et lamelle montre pour la femelle un tissu formé de grosses cellules (ovocytes).

*Les gonades mâles de chevaine* : elles sont toujours effilées et blanchâtres, voire rosées. Chez les jeunes mâles, leur section anguleuse permet la différenciation avec les gonades femelles, plus rondes. L'observation entre lame et lamelle à la loupe binoculaire montre un tissu d'aspect laiteux sans cellule visible.



L'ensemble des opérations de dissection, mesure, conditionnement et prise de notes nécessite la présence de deux opérateurs.

## 5 METHODE D'ANALYSE ENZYMATIQUE ET TRAITEMENT DES RESULTATS

### 5.1 Principe et méthode de dosage

Le dosage de l'activité EROD et un dosage de protéines sont effectués sur le surnageant de l'homogénat de foie après centrifugation à 9000 g (fraction S9).

Ce dosage repose sur la détection de la fluorescence de la résorufine, produit de transformation de la 7-éthoxyrésorufine par l'activité enzymatique à cytochrome P450 (Figure 2). L'activité EROD est donc la quantité de résorufine formée par unité de temps, rapportée à la quantité de protéines de l'échantillon. Elle est exprimée généralement en pmol/min/mg protéines.

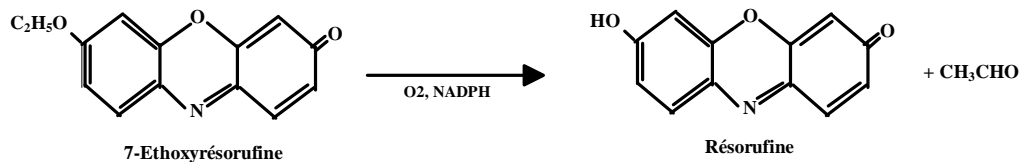


Figure 2. Réaction catalysée par l'EROD.

Préalablement aux analyses, une série d'échantillons est décongelée en bain de glace puis centrifugée. Les S9 sont ensuite prélevés et maintenus au frais dans des tubes à essais jusqu'aux dosages qui doivent être effectués dans l'heure pour l'activité EROD et dans la journée pour les protéines.

Le dosage de l'activité EROD met en présence l'échantillon (S9) et un substrat, l'éthoxyrésorufine, la réaction étant déclenchée par l'ajout d'un catalyseur, le co-enzyme NADPH. L'émission de fluorescence est mesurée à 590 nm au moyen d'un fluorimètre. Les nécessités de l'utilisation du dosage de l'EROD en biosurveillance avec une lecture rapide des

activités enzymatiques sur un grand nombre de poissons ont poussé certains laboratoires à adapter cette méthode sur microplaque (par exemple (Eggens *et al.* 1992; Flammarion *et al.* 1998b)).

Le protocole est normalisé à l'AFNOR (NF T 90-385) depuis septembre 2001.

Le dosage des protéines s'effectue au moyen d'une méthode colorimétrique. Les méthodes de Lowry (Lowry *et al.* 1951) ou de Bradford (Bradford 1976) sont les plus utilisées. Il existe des kits commerciaux basés sur ces méthodes.

## 5.2 Présentation des résultats d'activités EROD

La comparaison statistique des groupes de résultat (station, sexe, age..) s'effectue de préférence au moyen de tests paramétriques tel que le test t (2 groupes) ou l'ANOVA (plusieurs groupes). Ces tests exigent au moins dix individus par groupe, une distribution normale des résultats et une homogénéité de variance entre groupes.

Or, quel que soit le groupe de poissons étudié, on peut observer que la variabilité (écart-type) des activités EROD augmente proportionnellement à la moyenne des activités EROD des poissons du groupe. Autrement dit, plus les poissons sont globalement induits et plus il y a de grandes variations d'activités EROD d'un individu à l'autre. Dans ces conditions, l'homogénéité des variances entre groupes n'est pas respectée et la distribution des valeurs EROD est dissymétrique. La moyenne arithmétique est donc très influencée par les fortes activités.

En conséquence, afin d'établir une bonne description de chaque groupe et de permettre l'analyse statistique, une transformation logarithmique des résultats permet de stabiliser la variance et d'obtenir la normalité (Flammarion *et al.* 1998b; Tomassone *et al.* 1993). Un résultat « EROD » devient ainsi «  $\ln(1+EROD)$  ». La moyenne d'un groupe et l'intervalle de confiance se calcule alors sur les données log transformées. Cette moyenne traduit en unité log la moyenne géométrique exprimée en pmol/min/mg protéines

### 5.3 Correction éventuelle des activités EROD des femelles

Pour les études in situ il est généralement préférable de n'utiliser que des mâles car l'activité EROD des femelles varie avec leur degré de maturité sexuelle.

Chez l'espèce chevaine, lorsque l'échantillonnage n'a pas permis de prélever des mâles en nombre suffisant sur une ou plusieurs stations, une formule corrective basée sur le RGS (Flammarion et Garric 1999b) permet de corriger l'activité EROD des femelles pour la rendre équivalente à celle des mâles. Cela permet de grouper indifféremment des chevaines de l'un ou de l'autre sexe.

La formule est la suivante :

$$\frac{\text{Ln}(1+\text{EROD})}{1.1-0.28 \text{ Ln}(1+\text{RGS})}$$

EROD = activité EROD de la femelle exprimée en pmol/min/mg protéines

RGS = rapport gonado somatique de la femelle =(poids gonades/poids total) x100

### 5.4 Classes de « qualité EROD »

Des considérations statistiques (risques de 1<sup>ère</sup> et de 2<sup>ième</sup> espèces), sur lesquelles nous n'insisterons pas dans le cadre de ce guide technique, ont permis de fixer des classes d'induction de l'EROD (Flammarion et Garric 1999b).

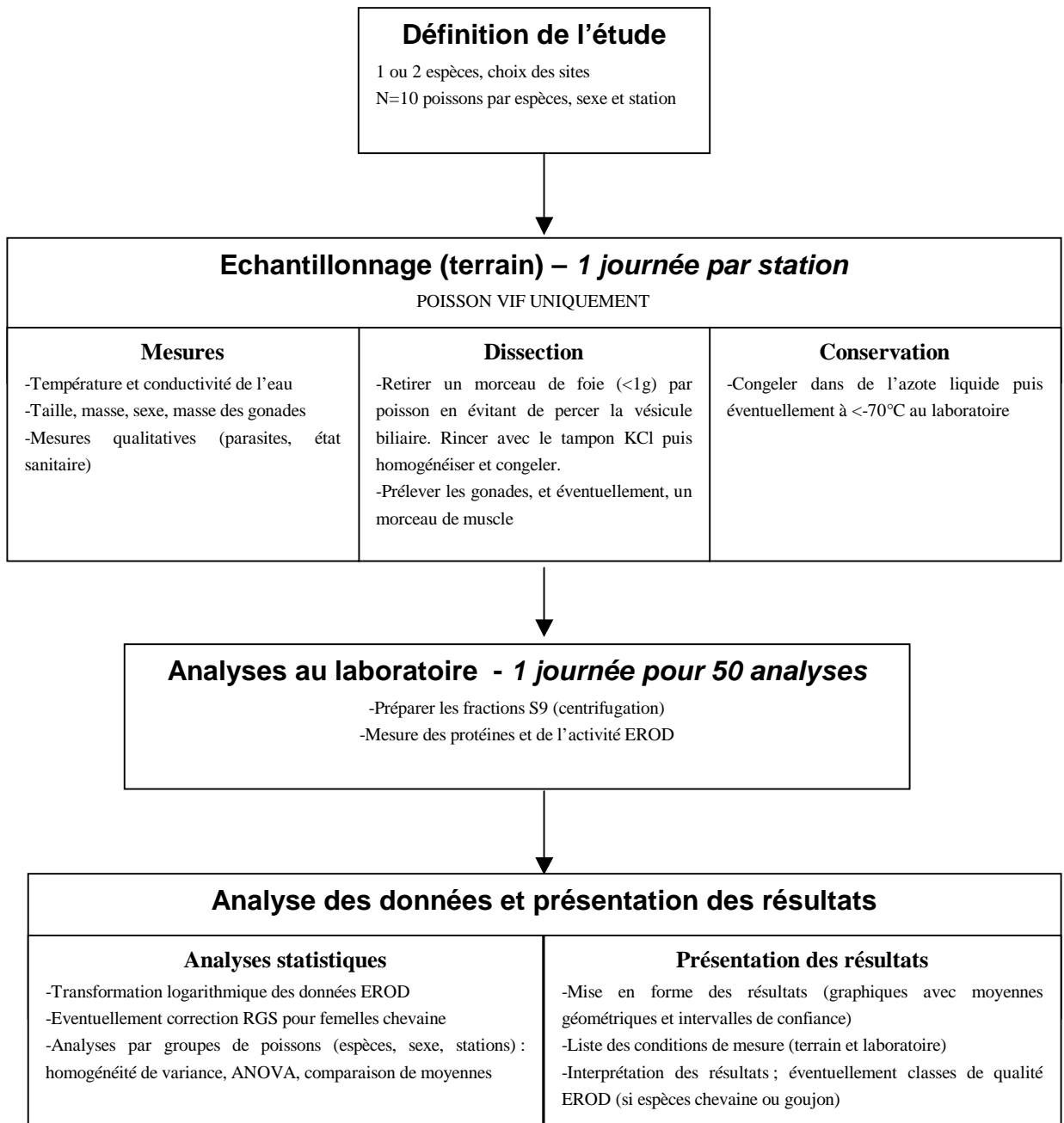
Au même titre que d'autres indices biologiques, les biomarqueurs, sont susceptibles d'entrer dans la définition d'un état biologique de référence au titre de la directive cadre eau (DCE). La classe 1 du biomarqueur EROD qui décrit ainsi une absence d'exposition à des inducteurs pourrait rejoindre les références d'autres indices biologiques pour définir le très bon état biologique d'un milieu aquatique. Au paragraphe 6 (Exemple d'application), un exemple de correspondance avec les classes de qualité de l'IBGN et de l'indice poissons (tableau 7) est présenté.

Tableau 5. Classes retenues comme significatives pour 2 espèces de cyprinidés pour le classement d'un groupe de 10 poissons

Espèce	Sexe	Saison	classes pour les moyennes géométriques EROD (pmol/min/mg protéines)				
			<6	6-12	12-25	25-50	>50
Chevaine	Femelle	Printemps	<6	6-12	12-25	25-50	>50
		Automne	<5	5-9	9-17	17-30	>30
	Mâle	Printemps	<12	12-22	22-40	40-72	>72
		Automne	<11	11-18	18-30	30-55	>55
	<b>Adultes<sup>a</sup></b>		<b>&lt;10</b>	<b>10-18</b>	<b>18-35</b>	<b>35-60</b>	<b>&gt;60</b>
	Juvénile	Printemps	<25	25-50	50-100	100-200	>200
Automne		<13	13-21	21-35	35-60	>60	
Goujon	Femelle	Printemps	<12	12-25	25-50	50-100	>100
		Automne	<29	29-43	43-66	66-100	>100
	Mâle	Printemps	<35	35-64	64-120	120-220	>220
		Automne	<23	23-35	35-52	52-78	>78

<sup>a</sup>Lorsque mâles et femelles sont mélangés grâce à l'utilisation de la formule correctrice du RGS (voir ci-dessus).

## 5.5 Résumé des diverses étapes



## 6 UN EXEMPLE D'APPLICATION

L'exemple qui suit a profité de l'échantillonnage effectué par le CSP à l'occasion d'une étude interagences réalisée en automne 1999 sous la responsabilité de l'Agence Seine Normandie (Flammarion *et al.* 2001).

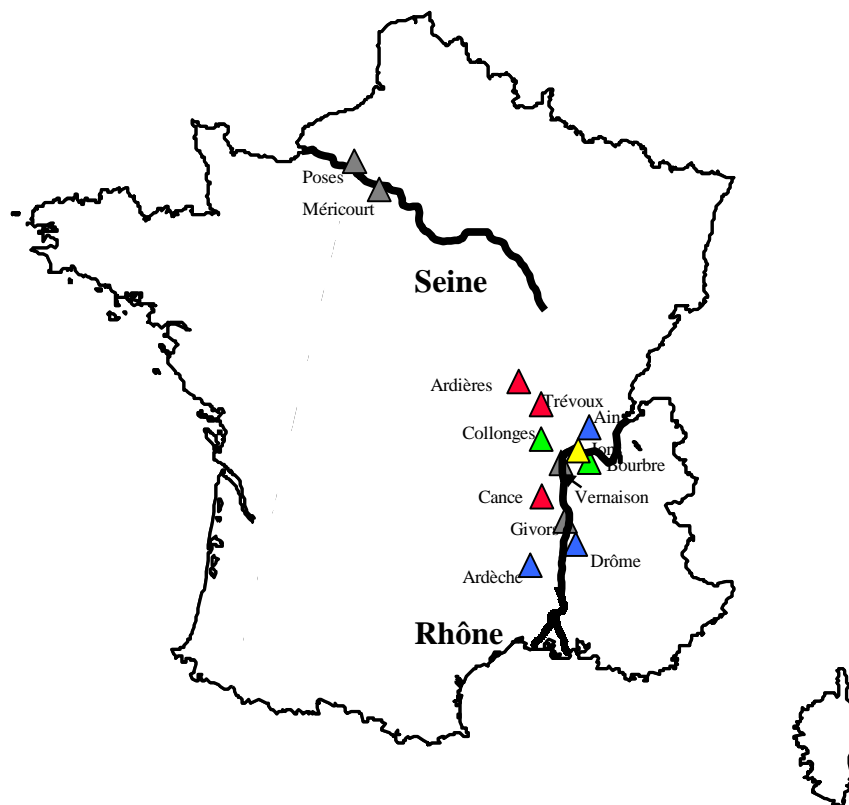
Tableau 6. Descriptif sommaire des stations de pêche (modifié d'après (Flammarion *et al.* 2001))

Station	Rivière	X	Y	Date (1999)
Méricourt	Seine	548,7	2445,3	21-sept
Poses	Seine	518,3	2479,7	22-sept
Cance	Cance	792,4	2026,0	17-août
Ardèche	Ardèche	780,1	1923,7	19-août
Bourbre	Bourbre	821,7	2089,0	25-août
Ain	Ain	824,7	2099,3	30-août
Ardières	Ardières	777,9	2127,7	31-août
Drôme	Drôme	827,0	1970,3	02-sept
Collonges	Saône	795,5	2093,6	03-sept
Trévoux	Saône	785,6	2107,1	13-sept
Vernaison	Rhône	793,3	2074,8	20-oct
Chasse	Rhône	790,8	2067,5	21-oct
Jons	Rhône	814,0	2093,7	03-nov

X et Y = coordonnées géographiques

Les foies de 10 chevaines mâles ont été échantillonnés par station puis les dosages EROD ont été réalisés au laboratoire d'écotoxicologie du Cemagref. Après analyse statistique, les résultats ont été interprétés de deux façons :

1. **Carte de qualité** (avec 5 couleurs pour les 5 classes de qualité EROD) : voir carte ci-dessous pour les 13 stations.
2. Lien de l'induction EROD avec les **micropolluants bioaccumulés** dans les chairs de chevaine.



Ces classes de qualité EROD se répartissent de la façon suivante :

Classes	Stations	Hypothèses
classe 1 (de référence)	Ain, Ardèche, Drôme	Aucune exposition des poissons à des inducteurs
classe 2 et classe 3 (induction EROD modérée)	Bourbre, Collonges, Jons	Induction modérée à des inducteurs
classe 4 et classe 5 (induction EROD forte)	Ardères, Cance, Givors, Méricourt, Poses, Trévoux, Vernaison	Induction à de fortes doses en inducteurs, risque d'effets irréversibles sur les individus et la population

Nous disposons d'ailleurs d'informations sur la bioaccumulation de micropolluants chlorés (PCB notamment) dans les muscles des chevaines échantillonnés lors de cette étude.

Le prélèvement d'une quantité de muscle (environ 50g répartis sur tous les poissons de l'espèce pour une station) peut en effet être utile pour confirmer si la responsabilité de l'induction EROD est à attribuer à la présence de contaminants bioaccumulés.

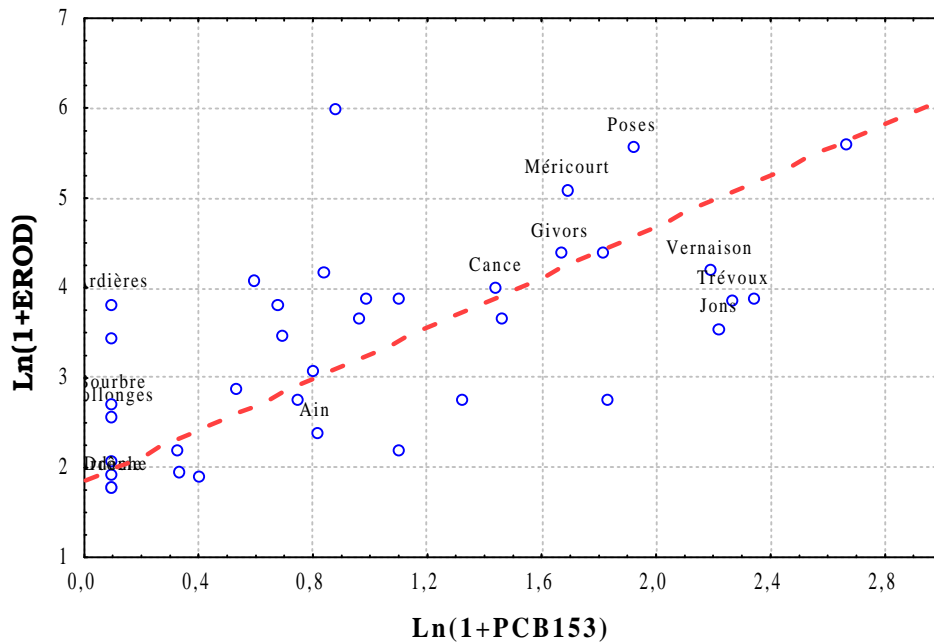


Figure 3. Relation entre activité EROD (chevaines) et PCB bioaccumulés dans le muscles. La droite en pointillés est celle obtenue par l'ensemble des données du même type par le Cemagref (points sans étiquette de station).

Les résultats EROD obtenus pour certains sites ne peuvent s'expliquer uniquement par la concentration en PCB bioaccumulés (Figure 3). Par exemple les chevaines des stations Ardières, Bourbre, Méricourt, Poses sont probablement exposés à d'autres inducteurs de l'EROD dont on ne trouve pas trace dans le poisson (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques par exemple) ce qui expliquerait ces niveaux d'induction EROD assez élevés par rapport à la droite en pointillés de la figure ci-dessus.

Les résultats qui présentent une activité EROD inférieure à celle potentiellement expliquée par les PCB (par exemple Jons et Trévoux) pourraient s'expliquer par l'exposition des poissons à des inhibiteurs de l'EROD comme les métaux et certains pesticides (Flammarion *et al.* 1996; Flammarion *et al.* 1998c; Stien *et al.* 1997).

Les molécules chimiques dosées dans le cadre de cette étude ne sont cependant pas exhaustives en terme d'inducteurs potentiels. On ne saurait donc conclure que la mesure de l'EROD n'indique que la contamination en PCB. En effet, d'autres études ont observé des corrélations avec d'autres familles chimiques (les HAP notamment). Par exemple, il a été observé, au cours



d'études de zones côtières, que la contamination des sédiments en HAP pouvait être également un facteur explicatif déterminant (Lafaurie *et al.* 1992; Narbonne *et al.* 1991). Les HAP sont en général rapidement biotransformés et ne sont pas détectables dans le poisson (muscle ou foie) même si les concentrations d'exposition sont fortes (Varanasi *et al.* 1981).

- **Il faut donc garder à l'esprit qu'un niveau d'induction de l'EROD donne une information sur un niveau d'inducteurs (et leur biodisponibilité) dont il reste cependant à préciser la nature dans la situation particulière étudiée.**

Il est par ailleurs instructif de comparer, lorsque ces données sont disponibles, les classes de qualité EROD aux classes de qualité mesurées déterminées pour les indices IBGN et indices poissons (Tableau 7).

Tableau 7. Comparaison des classes EROD avec d'autres classes de qualité écologique.

Sites 1999	EROD	IBGN	indice poisson
Ain	1	1	1
Ardèche	1	1	1
Drôme	1	1	4
Bourbre	2	2	2
Collonges	2	3	NM
Jons	3	1	1
Ardières	4	4	3
Cance	4	3	4
Trévoux	4	2	4
Givors	5	2	3
Mericult	5	NM	3
Poses	5	2	2
Vernaison	5	2	3

Les informations complémentaires, et non contradictoires, apportées par ces différents indices traduisent les spécificités – ou l'absence de spécificité - par rapport aux contaminants de ces mesures biologiques. Par exemple il est probable que la mauvaise qualité des peuplements de poissons de la Drôme en 1999 soit due d'avantage à des problèmes d'habitat qu'à des concentrations élevées en contaminants.

## 7 CONCLUSION

"Un biomarqueur mesuré au niveau individuel ne trouve sa signification écotoxicologique que lorsqu'il permet de décrire, d'expliquer, voire même de prédire, les effets des polluants sur les populations et communautés évoluant dans leur environnement naturel" (Lagadic *et al.* 1997).

Il est certain qu'une perturbation de type biochimique telle que l'induction de l'EROD n'entraîne pas nécessairement des effets irréversibles pour l'organisme ni, *a fortiori*, pour les populations (Engel et Vaughan 1996). Cependant, tout stress entraîne une dépense énergétique pour l'organisme donc un coût, et, s'il se prolonge, il y a un risque non négligeable que d'autres effets apparaissent (sur la croissance, la reproduction...) (Adams 1990; Calow 1991). Ainsi, si effectivement le biomarqueur EROD ne fournit pas toutes les informations<sup>3</sup>, il peut cependant être intégré comme méthode précoce et sensible dans le cadre d'un diagnostic environnemental préalable à des investigations plus lourdes, voire être intelligemment utilisé dans une évaluation de risque (Adams 2001; Adams *et al.* 2001; Adams *et al.* 2000).

Pour les stations d'un réseau de biosurveillance on obtient au final (après dosage des activités EROD au laboratoire) une carte des qualité EROD qui permet de poser le diagnostic (bonne ou mauvaise qualité) mais aussi un suivi dans le temps (amélioration ou dégradation). Dans ce dernier cas, une étude plus approfondie des effluents ou des sédiments peut être menée afin de cerner la cause de l'induction de l'EROD différentielle entre deux stations du réseau. Après des mesures correctives éventuelles, le suivi de l'EROD en réseau permet de vérifier l'amélioration de la situation à la station du réseau immédiatement à l'aval de l'effluent.

---

<sup>3</sup> Il n'existe pas de biomarqueur idéal, ni informatif sur toutes les molécules chimiques, ni prédictif quant aux effets à tous les niveaux d'intégration biologique. Doit être privilégiée une combinaison à la fois d'une batterie de biomarqueurs et d'une batterie de bioindicateurs dont la complémentarité de diagnostics permette de déterminer en temps réel les sources et les types de stress, l'état de santé des populations, de guider les efforts de restauration et d'évaluer les résultats de la gestion des milieux (Adams 2001; Cormier *et al.* 1994; Munkittrick *et al.* 1995; Vindimian *et al.* 1993).

## 8 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams, S. M. (1990). Status et use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. *American Fisheries Society Symposium* **8**, 1-8.
- Adams, S. M. (2001). Biomarker/bioindicator response profiles of organisms can help differentiate between sources of anthropogenic stressors in aquatic ecosystems. *Biomarkers* **6**, 33-44.
- Adams, S. M., Giesy, J. P., Tremblay, L. A., et Eason, C. T. (2001). The use of biomarkers in ecological risk assessment: recommendations from the Christchurch conference on Biomarkers in Ecotoxicology. *Biomarkers* **6**, 1-6.
- Adams, S. M., Greeley, M. S., et Ryon, M. G. (2000). Evaluating effects of contaminants on fish health at multiple levels of biological organization : extrapolating from lower to higher levels. *Human and Ecological Risk Assessment* **6**, 15-27.
- Addison, R. F., Hansen, P. D., Pluta, H. J., et Willis, D. E. (1991). Effects of ugilec-141, a PCB substitute based on tetrachlorobenzyltoluenes, on hepatic mono-oxygenase induction in estuarine fish. *Mar. Environ. Res.* **31**, 137-144.
- Andersson, T., et Koivusaari, U. (1985). Influence of environmental temperature on the induction of xenobiotic metabolism by B-naphthoflavone in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Environ. Toxicol. Chem.* , 43-50.
- Ankley, G. T., et Blazer, V. S. (1988). Effects of diet on PCB-induced changes in xenobiotic metabolism in the liver of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **45**, 132-137.
- Baras, E. (1992). Contribution à l'étude des stratégies d'occupation du temps et de l'espace chez un poisson téléostéen dulcicole, le barbeau fluviatile, *Barbus barbus* (L.). Etude par radiopistage, pêche à l'électricité et observation directe, p. 193.
- Benson, W. H., et Di Giulio, R. T. (1992). Biomarkers in hazard assessment of contaminated sediments. In *Sediment toxicity assessment* (G. A. Burton, ed., pp. 241-265. Lewis Publishers, Boca Raton.
- Bradford, 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.
- Bucheli, T. D., et Fent, K. (1995). Induction of Cytochrome P450 as a Biomarker for Environmental Contamination in Aquatic Ecosystems. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **25**, 201-268.
- Calow, P. (1991). Physiological costs of combating chemical toxicants : ecological implications. *Comp. Biochem. Physiol.* **100C**, 3-6.
- Cormier, S. M., et Daniel, B. F. (1994). Biomarkers: taking the science forward (editorial). *Environ. Toxicol. Chem.* **13**, 1011-1012.
- Eggens, M. L., et Galgani, F. (1992). Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in flatfish : fat determination with a fluorescence plate-reader. *Mar. Environ. Res.* **33**, 213-221.

- Engel, D. W., et Vaughan, D. S. (1996). Biomarkers, natural variability, and risk assessment: can they coexist? *Human and Ecological Risk Assessment* **2**, 257-262.
- Flammarion, P. (1997). Mesure *in situ* de l'induction du cytochrome P450 1A chez des cyprinidés d'eau douce. Optimisation de l'interprétation. In Doctorat de spécialité , Toxicologie de l'Environnement. Université de Metz, p. 216 pages. Doctorat de spécialité , Toxicologie de l'Environnement. Université de Metz.
- Flammarion, P., Fortier, V., Migeon, B., Morfin, P., et Garric, J. (1999a). Cytochrome P450 IA induction in gudgeon (*Gobio gobio*): laboratory and field studies. *Biomarkers* **4**, 59-71.
- Flammarion, P., et Garric, J. (1997). Cyprinids reference EROD levels in low contaminated rivers : a relevant statistical approach to estimate reference levels for EROD biomarker. *Chemosphere* **35**, 2375-2388.
- Flammarion, P., et Garric, J. (1999b). A statistical approach for classifying the extent of EROD induction of fish sampled in clean and contaminated waters. *Wat. Res.* **33**, 2683-2689.
- Flammarion, P., Garric, J., et Monod, G. (1998a). Utilisation de l'activité enzymatique EROD chez les poissons des hydrosystèmes continentaux. In Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement (L. Lagadic, T. Caquet, J. C. Amiard et F. Ramade, eds.), pp. 57-75. Tec & Doc Lavoisier.
- Flammarion, P., Migeon, B., et Garric, J. (1996). Joint effects of copper sulphate and methidathion on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) EROD and AChE activities. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **56**, 440-445.
- Flammarion, P., Migeon, B., et Garric, J. (1998b). Statistical analysis of cyprinids EROD data in a large French watershed. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **40**, 144-153.
- Flammarion, P., Migeon, B., Urios, S., Morfin, P., et Garric, J. (1998c). Effect of methidathion on the cytochrome P-450 1A in the cyprinid fish gudgeon (*Gobio gobio*). *Aquat. Toxicol.* **42**, 93-102.
- Flammarion, P., Noury, P., Brion, F., Garric, J., Babut, M., et Palazzi, X. (2001). Incidence d'anomalies histologiques dans les gonades de poissons d'eau douce mâles, p. 36 p. + annexes. Cemagref/Agence de l'Eau Seine-Normandie, Lyon.
- Forlin, L., Balk, L., Celander, M., Bergek, S., Hjelt, M., Rappe, C., Dewit, C., et Jansson, B. (1992). Biotransformation Enzyme-Activities and Pcd/Pcdf Levels in Pike Caught in a Swedish Lake. *Mar. Environ. Res.* **34**, 169-173.
- Forlin, L., et Celander, M. (1993). Induction of cytochrome P450 1A in teleosts : environmental monitoring in swedish fresh, brackish and marine waters. *Aquat. Toxicol.* **26**, 41-56.
- Forlin, L., et Haux, C. (1990). Sex differences in hepatic cytochrome P-450 monooxygenase activities in rainbow trout during an annual reproductive cycle. *Journal of Endocrinology* **124**, 207-213.
- Galgani, F., Bocquene, G., Lucon, M., Grzebyk, D., Letrouit, D. F., et Claisse, D. (1991). EROD measurements in fish from the northern part of France. *Mar. Pollut. Bull.* **22**, 494-500.

- Garric, J., Bray, M., Migeon, B., Vollat, B., et Richert, C. (1994). Evaluation de l'écotoxicité de rejets industriels et urbains et de la contamination du milieu récepteur : application à la Moselle à l'amont de Nancy, p. 33 pages. Cemagref Lyon.
- Goksoyr, A., et Forlin, L. (1992). The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquat. Toxicol.* **22**, 287-312.
- Hodson, P. V., Kloepper-Sams, P. J., Munkittrick, K. R., Lockhart, W. L., Metner, D. A., Luxon, P. L., Smith, I. R., Gagnon, M. M., Servos, M., et Payne, J. F. (1991). Protocols for measuring mixed function oxygenases of fish liver. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences* **1829**, 51.
- Huggett, R. J., Kimerle, R. A., Mehrle, P. M., et Bergman, H. L. (1992). *Biomarkers : biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress*. Lewis Publishers, Boca Raton.
- Jimenez, B. D., et Burtis, L. S. (1988). Response of the mixed-function oxidase system to toxicant dose, food and acclimation temperature in the bluegill sunfish. *Mar. Environ. Res.* **24**, 45-49.
- Kestemont, P. (1989). Etude du cycle reproducteur du goujon, *Gobio gobio* L. 2. Variations saisonnières dans l'histologie des testicules. *Journal of Applied Ichthyology* **5**, 111-121.
- Kleinow, K. M., Haasch, M. L., et Lech, J. J. (1986). The effect of tricaine anesthesia upon induction of select P-450 dependent monooxygenase activities in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquat. Toxicol.* **8**, 231-241.
- Kloepper-Sams, P. J., et Stegeman, J. J. (1992). Effects of temperature acclimation on the expression of hepatic cytochrome P4501A mRNA and protein in the fish *Fundulus heteroclitus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **299**, 38-46.
- Lafaurie, M., Narbonne, J. F., et Galgani, F. (1992). Indicateurs biochimiques de contamination de l'environnement marin. *Analisis* **20**, 27-33.
- Lagadic, L., Caquet, T., et Amiard, J. C. (1997). Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. In *Biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux* (L. Lagadic, T. Caquet, J. C. Amiard et F. Ramade, eds.), pp. 1-9. Masson, Paris.
- Larsen, E. H., Celander, M., et Goksoyr, A. (1992). The cytochrome P450 system of Atlantic salmon (*Salmo salar*) : II. variations in hepatic catalytic activities and isozyme patterns during an annual reproductive cycle. *Fish Physiol. Biochem.* **10**, 291-301.
- Lindstrom-Seppa, P., et Oikari, A. (1988). Hepatic xenobiotic bio-transformation in fishes exposed to pulpmill effluents. *Wat. Sci. Tech.* **20**, 167-170.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., et Randall, R. J. (1951). Protéin measurement with the Folin phenolreagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**.
- Machala, M., Nezveda, K., Petrivalsky, M., Jarosova, A. B., Piacka, V., et Svobodova, Z. (1997). Monooxygenase activities in carp as biochemical markers of pollution by polycyclic and polyhalogenated aromatic hydrocarbons: choice of substrates and effects of temperature, gender and capture stress. *Aquat. Toxicol.* **37**, 113-123.
- Masfaraud, J. F., Monod, G., et Devaux, A. (1990). Use of the fish cytochrome P-450 dependent 7-ethoxyresorufin O-deethylase activity as a biochemical indicator of water

pollution. Study of the liver and the kidney of male and female nase (*Chodrostoma nasus*) from the river Rhône. *Sci. Tot. Environ.* **97-98**, 729-738.

Mayer, F. L., Versteeg, D. J., Mac Kee, M. J., Folmar, L. C., Graney, R. L., Mac Cume, D. C., et Rattner, B. A. (1992). Physiological and nonspecific biomarkers. In Biomarkers : biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress (R. J. Huggett, R. A. Kimerle, P. M. Mehrle et H. L. Bergman, eds.), pp. 5-86. Lewis Publishers, Chelsea.

Mc Carthy, J. F. (1990). Concluding remarks : implementation of a biomarker based environmental monitoring program. In Biomarkers of environmental contamination (J. F. Mc Carthy et L. R. Shugart, eds.), pp. 429-439. Lewis Publishers, Boca Raton.

Monod, G., Devaux, A., et Riviere, J. L. (1988). Effects of chemical pollution on the activities of hepatic xenobiotic metabolizing enzymes in fish from the river Rhône. *Sci. Tot. Environ.* **73**, 189-201.

Munkittrick, K. R., et Mc Carthy, L. S. (1995). An integrated approach to aquatic ecosystem health : top-down, bottom-up or middle-out ? *Journal of Aquatic Ecosystem Health* **4**, 77-90.

Munns, W. R., Black, D. E., Gleason, T. R., Salomon, K., Bengtson, D., et Gutjahr-Gobell, R. (1997). Evaluation of the effects of dioxin and PCBs on *Fundulus heteroclitus* populations using a modeling approach. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 1074-1081.

Narbonne, J. F., Garrigues, P., Ribera, D., Raoux, C., Mathieu, A., Lemaire, P., Salaun, J. P., et Lafaurie, M. (1991). Mixed-function oxygenase enzymes as tools for pollution monitoring : field studies on the French coast of the Mediterranean sea. *Comp. Biochem. Physiol.* **100C**, 37-42.

Payne, J. F. (1976). Field evaluation of benzopyrene hydroxylase induction as a monitor for marine petroleum pollution. *Science* **191**, 945-946.

Payne, J. F., et Penrose, W. R. (1975). Induction of aryl hydrocarbon (Benzo [a] pyrene) hydroxylase in fish by petroleum. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **14**, 112-116.

Richert, C. (1994). Comparaison des marqueurs biochimiques chez les poissons (induction de l'activité éthoxyrésorufine-O-dééthylase et inhibition de l'activité acétylcholinestérase) et indicateurs écologiques (peuplement de macroinvertébrés) pour le diagnostic *in situ* de la pollution toxique dans les cours d'eau, p. 170 pages. Université Lyon I, 1994.

Sleiderink, H. M., Beyer, J., Scholtens, E., Goksoyr, A., Nieuwenhuize, J., Van Liere, J. M., Everaarts, J. M., et Boon, J. P. (1995). Influence of temperature and polyaromatic contaminants on CYP1A levels in North sea dab (*Limanda limanda*). *Aquat. Toxicol.* **32**, 189-209.

Snowberger, G., E., Woodin, B. R., et Stegeman, J. J. (1991). Sex differences in hepatic monooxygenase in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) and scup (*Stenotomus chrysops*) and regulation of P450 forms by estradiol. *Journal of Experimental Zoology* **259**, 330-342.

Stegeman, J. J., et Hahn, M. E. (1994). Biochemistry and molecular biology of monooxygenases : current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In Aquatic Toxicology : molecular, biochemical and cellular perspectives (D. C. Malins et G. K. Ostrander, eds.), pp. 87-206. Lewis Publishers, Boca Raton.

- Stegeman, J. J., Teng, F. Y., et Snowberger, E. A. (1987). Induced cytochrome P450 in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) from coastal Massachusetts evaluated by catalytic assay and monoclonal antibody probes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **44**, 1270-1277.
- Stien, X., Risso, C., Gnassia-Barelli, M., Romeo, M., et Lafaurie, M. (1997). Effect of copper chloride *in vitro* and *in vivo* on the hepatic EROD activity in the fish *Dicentrarchus labrax*. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 214-219.
- Tomassone, R., Dervin, C., et Masson, J. P. (1993). *Biométrie. Modélisation de phénomènes biologiques*. Masson, Paris.
- Vanderoost, R., Vangastel, L., Worst, D., Hanraads, M., Satumalay, K., Vanschooten, F. J., Heida, H., et Vermeulen, N. P. E. (1994). Biochemical Markers in Feral Roach (*Rutilus-Rutilus*) in Relation to the Bioaccumulation of Organic Trace Pollutants. *Chemosphere* **29**, 801-817.
- Varanasi, U., et Gmur, D. J. (1981). Hydrocarbons and metabolites in english sole (*Parophrys vetulus*) exposed simultaneously to [3H]benzo[a]pyrene and [14C]naphthalene in oil-contaminated sediment. *Aquat. Toxicol.* **1**, 49-67.
- Vindimian, E., et Garric, J. (1993). Bio-essais et bio-indicateurs de toxicité dans le milieu naturel, p. 61 pages. Etude inter-agence Numéro 17.
- Vindimian, E., Namour, P., Migeon, B., et Garric, J. (1991). *In situ* pollution induced cytochrome P450 activity of freshwater fish : barbel (*Barbus barbus*), chub (*Leuciscus cephalus*) and nase (*Chondrostoma nasus*). *Aquat. Toxicol.* **21**, 255-266.
- White, J. J., Jung, R. E., Schmitt, C. J., et Tillitt, D. E. (2000). Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit. Rev. Toxicol.* **30**, 347-570.