Mesure in situ de l'induction du cytochrome P450 1A chez des cyprinidés d'eau douce : optimisation de l'interprétation

Patrick Flammarion

▶ **To cite this version:**

Patrick Flammarion. Mesure in situ de l'induction du cytochrome P450 1A chez des cyprinidés d'eau douce : optimisation de l'interprétation. Toxicologie. Université Paul Verlaine - Metz, 1997. Français. NNT : 1997METZ049S . tel-01777228

HAL Id: tel-01777228
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01777228

Submitted on 24 Apr 2018

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.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

b 120726

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ
N° inv. 19971025
Cote S/M3 97/49
Loc Magasin

THESE

présentée devant

l'Université de METZ

UFR Sciences Fondamentales et Appliquées

pour l'obtention du grade de Docteur

spécialité : Toxicologie de l'Environnement

par Patrick FLAMMARION

Mesure *in situ* de l'induction du cytochrome P450 1A chez des cyprinidés d'eau douce. Optimisation de l'interprétation.

soutenue le 5 décembre 1997

Après avis de :

Mme AMIARD-TRIQUET, Directeur de Recherche au CNRS (rapporteur).

M. LAFAURIE, Maître de Conférences à la Faculté de Médecine de Nice (rapporteur).

Devant le Jury formé de :

M. ALZIEU, Directeur de département à l'IFREMER.

Mme AMIARD-TRIQUET, Directeur de Recherche au CNRS.

M. DEVAUX, Ingénieur INRA.

M. FERARD, Professeur à l'Université de Metz.

Mme GARRIC, Chargée de recherche au Cemagref.

Mme VASSEUR, Professeur à l'Université de Metz.

REMERCIEMENTS

J'exprime ma profonde gratitude à la direction scientifique et à la direction des études de l'ENGREF qui m'ont permis de compléter ma formation par une activité de recherche au Cemagref.

Je remercie vivement le Professeur P. VASSEUR d'avoir accepté la direction de ce travail ainsi que Madame J. GARRIC qui a bien voulu m'accueillir dans le laboratoire d'écotoxicologie du Cemagref et m'y a encadré avec dynamisme.

Toute ma reconnaissance va à Madame AMIARD-TRIQUET et Monsieur LAFAURIE qui m'ont fait l'honneur d'accepter la lourde tâche de rapporteurs de cette thèse, ainsi qu'aux autres membres du Jury : Messieurs ALZIEU, DEVAUX et FERARD.

Monsieur le Professeur TOMASSONE n'a pu se joindre au Jury mais a eu l'extrême gentillesse de lui transmettre son avis sur l'approche statistique développée dans ce travail.

J'adresse également mes sincères remerciements et ma sympathie à tous les membres du Cemagref qui, d'une manière ou d'une autre, ont apporté leur pierre à ce travail : B. MIGEON pour son aide généreuse et sa grande compétence technique, P. MORFIN pour les bons soins dispensés aux poissons, S. ESPINASSE pour son efficacité légendaire au secrétariat. Je pense également à l'ensemble des participants aux campagnes de terrain : M. BRAY, M. POUILLY, A. THEVENET, S. VALENTIN, P. ROGER (sans qui le terrain ne serait pas vraiment le terrain)... ainsi qu'aux stagiaires pour leur motivation : V. FORTIER et S. URIOS. Ma thèse ne serait pas à jour des dernières nouvelles de la presse scientifique sans la diligence des documentalistes : M.P. BALIGAND et C. CADIOU.

Sans l'aide de J.P. CASTILLO et F. MASSAT du Laboratoire d'Analyse de la Drôme, de G. TOUSSAINT de l'Institut Pasteur de Lyon, de C. GARON-BOUCHER, B. LAILLET, B. MOTTE, G. ROFES et J.L. ROULIER du Cemagref, cette étude aurait souffert d'un manque de rigueur analytique.

Des chercheurs ont contribué à l'avancement de mes travaux, qu'ils soient assurés de ma reconnaissance pour leur disponibilité cordiale : A. DEVAUX et G. MONOD pour un travail de collaboration passionnant, H. FENET et X. STIEN pour l'apprentissage de l'immunodétection, C. MILLIER, R. TOMASSONE et E. VINDIMIAN pour leurs conseils éclairés en statistiques.

Je suis spécialement reconnaissant à tous ceux qui ont accepté de relire mes comptes-rendus d'avancement tout au long de mon travail de thèse : J. BERGE de l'INRA d'Antibes, S. BLANQUET de l'Ecole polytechnique, M. LAFAURIE de la Faculté de Médecine de Nice, M. LAFONT, L.A. LECLERC et Y. SOUCHON du Cemagref, C. MILLIER de l'ENGREF, P.VASSEUR de l'Université de Metz... ainsi que ceux qui ont accepté d'apporter des remarques aux premières versions de ce manuscrit. A ce titre je tiens à remercier chaleureusement mes collègues thésards du Cemagref ou d'ailleurs.

Enfin, que M. BABUT et M. BONNEFILLE, pour les données de terrain, ainsi que M. GIRAUD, l'unique fournisseur de goujons en France, soient remerciés pour le temps qu'ils ont consacré à cette étude.

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans les soutiens financiers du GIP Hydrosystèmes, de l'Agence de l'eau Rhône-Méditerranée-Corse et de la Compagnie Nationale du Rhône.

Que ceux que j'aurais pu oublier puissent m'en excuser !

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE 10

1.1 INTRODUCTION 10

1.1.1 Bioindicateurs et biomarqueurs 10

1.1.2 Le biomarqueur induction du cytochrome P450 1A 12

1.1.3 Exemples d'utilisation de la mesure de l'induction du cytochrome P450 1A chez les poissons 21

1.1.4 Référence et perturbation 22

1.2 OBJECTIFS 24

1.3 MÉTHODOLOGIE 24

1.4 ORGANISATION DES TRAVAUX ET DE LEUR VALORISATION 25

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES 27

2.1 DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE 27

2.1.1 Sur le terrain 28

2.1.2 En laboratoire 28

2.2 LES POISSONS 29

2.2.1 Choix des espèces 29

2.2.2 Le barbeau 32

2.2.3 Le chevaine 32

2.2.4 Le goujon 32

2.2.5 Variables biologiques mesurées 32

2.3 SECTEURS D'ÉTUDE 35

2.3.1 Localisation et échantillonnage 35

2.3.2 Description des sites 35

2.4 ANALYSE CHIMIQUE DES CHAIRS ET DES SÉDIMENTS 36

2.4.1 Campagnes de sédiments 36

2.4.2 Campagnes de collecte de chair de poisson 37

2.4.3 Choix de la stratégie de dosage 37

2.5 MESURE DE L'ACTIVITÉ EROD 40

2.5.1 Principe de la méthode de dosage 40

2.5.2 Présentation des résultats d'activités EROD 40

2.5.3 Inductibilité des espèces retenues 42

2.6 DOSAGE PAR VOIE IMMUNOCHIMIQUE 43

3. RÉSULTATS 46

3.1 ACTIVITÉS EROD MESURÉES EN SITES PEU POLLUÉS SUR DES CYPRINIDÉS 46

3.1.1 Objectifs 46

3.1.2 Méthodologie 46

3.1.3 Résultats 47

3.1.4 Discussion et conclusion 50

3.2 FACTEURS DE VARIABILITÉ DE L'ACTIVITÉ EROD *IN SITU* 52

3.2.1 Objectifs 52

3.2.2 Méthodologie 52
3.2.3 Résultats et discussion 52
3.2.4 Conclusion 56
3.3 QUANTIFICATION EN LABORATOIRE DES VARIABILITÉS DE L'INDUCTION DE L'EROD 56
3.3.1 Objectifs 56
3.3.2 Méthodologie 57
3.3.3 Résultats et discussion 57
3.3.4 Conclusion 61
3.4 ETUDE DE CAS D'INHIBITION DE TERRAIN ET DE LABORATOIRE 61
3.4.1 Objectifs 61
3.4.2 Méthodologie 62
3.4.3 Résultats et discussion 62
3.4.4 Conclusion 65
3.5 SITUATION DE L'EROD PAR RAPPORT À D'AUTRES MESURES CHIMIQUES OU BIOLOGIQUES 66
3.5.1 Objectifs 66
3.5.2 Résultats et discussion 66
3.5.3 Conclusion 72
3.6 VERS DES CLASSES DE « QUALITÉ EROD » 72
3.6.1 Objectifs 72
3.6.2 Repères statistiques sur l'EROD 72
3.6.3 Puissance de discrimination et classes de « qualité EROD » 74
3.6.4 Construction de classes d'induction de l'activité EROD 78
3.6.5 Discussion 81
3.6.6 Conclusion 82

4. DISCUSSION GÉNÉRALE 83

4.1 MÉTHODOLOGIE 83
4.1.1 Terrain et laboratoire 83
4.1.2 Descripteurs biologiques 84
4.1.3 Descripteurs chimiques 85
4.2 PERSPECTIVES 86
4.2.1 Pertinence écologique ...? 86
4.2.2 ...ou sonde chimique ? 88
4.2.3 Stratégie pratique 89

5. CONCLUSION GÉNÉRALE 93

5.1 SYNTHÈSE DES RÉSULTATS 93
5.2 BILAN MÉTHODOLOGIQUE 94
5.3 PERSPECTIVES 94

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES
ANNEXE A : DOSAGE DE L'ACTIVITE EROD SUR MICROPLAQUE
ANNEXE B : DONNEES EROD
ARTICLES 1 A 8

RESUME

Mesure *in situ* de l'induction du cytochrome P450 1A chez des cyprinidés d'eau douce. Optimisation de l'interprétation.

La mesure de variables biologiques est complémentaire des analyses chimiques pour l'évaluation de la qualité de l'eau. En particulier, les biomarqueurs biochimiques permettent une détection précoce de l'exposition et de la réponse d'organismes aquatiques à des polluants.

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) rend 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.

Nous avons donc réalisé une large collecte de données sur des cyprinidés du bassin du Rhône afin d'étudier des relations entre les informations chimiques et biologiques (dont l'EROD) relatives à des rivières polluées ou non. Les résultats obtenus permettent d'avancer des valeurs de référence pour l'activité EROD de trois espèces : barbeau, chevaine et goujon. Des situations perturbées (sites sur la Saône et le Rhône) ont aussi été étudiées et interprétées en liaison avec la pollution et les facteurs naturels de variabilité de la réponse EROD (maturité sexuelle notamment). En parallèle, des expériences de laboratoire ont permis d'étudier et de quantifier l'influence de la dose de l'inducteur et de la maturité sexuelle ainsi que la sensibilité et la réversibilité de l'induction de l'EROD. La détection complémentaire du cytochrome P450 1A par une méthode immunochimique a par ailleurs permis d'améliorer le diagnostic dans certaines situations de terrain ou de laboratoire, où des phénomènes d'inhibition de l'activité étaient possibles.

L'ensemble de ces résultats permettent de proposer, sur des critères statistiques, des classes d'induction de l'activité EROD pour les espèces de cyprinidés étudiées. La mesure de ce biomarqueur ainsi que l'interprétation des niveaux observés ont désormais une maturité suffisante pour s'engager dans une phase de normalisation de la mesure pour une utilisation dans des réseaux de suivi de la qualité des écosystèmes aquatiques.

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

ABSTRACT

***In situ* induction of the cytochrome P450 1A in freshwater cyprinids. Improvement of the assessment.**

Biological assessment is useful in addition to conventional chemical analyses to monitor the water quality. Biochemical markers are early warning systems of the exposition of aquatic organisms to pollutants.

Among them, the measurement of the fish EROD induction enables the detection of PAHs, PCBs and dioxines. The biomarker was used as a fitted tool in numerous limited field studies. Yet, in a large scale biomonitoring perspective, it is necessary to determine baseline values in sentinel fish species as well as to precisely quantify the biotic and abiotic sources of variability.

Cyprinids were thus sampled in the Rhône river watershed in low polluted and in polluted areas. Reference baseline EROD activities were calculated for three species : barbel, chub and gudgeon. The data from the polluted sites were related to contamination and female sexual maturity. In the same way, laboratory experiments provided information on the effect of the level of the inducer, the influence of the sexual maturity as well as the sensitivity and reversibility of the EROD induction. The immunodetection of the cytochrome P450 1A protein provided better assessment of results where an inhibition effect could have occurred.

With all results, a classification of the EROD levels was proposed through statistical analysis of the EROD distributional properties. Both measurement and interpretation of the EROD biomarker are then mature enough to begin a normalisation procedure in a biomonitoring perspective.

Keywords : fish, biomarker, EROD, variability, classification

Espèces de poissons citées

Nom latin	Nom français	Nom anglais
Abramis brama	Brème	Bream
Alburnus alburnus	Ablette	Bleak
Ameiurus (Ictalurus) nebulosus	Poisson chat	Brown bullhead
Anguilla anguilla	Anguille	Eel
Barbatula barbatula (Noemacheilus barbatulus)	Loche	Loach
Barbus barbus	Barbeau	Barbel
Chondrostoma nasus	Hotu	Nase
Cyprinus carpio	Carpe	Carp
Dicentrarchus labrax	Loup de mer (Bar)	Sea bass
Esox lucius	Brochet	Pike
Fundulus heteroclitus	Choquemort	Mummichog
Gadus morhua	Morue	Cod
Gobio gobio	Goujon	Gudgeon
Ictalurus punctatus	Poisson chat	Channel catfish
Leuciscus cephalus	Chevaine	Chub
Leuciscus idus	Ide mélanote	Golden ide
Leuciscus souffia	Blageon	Blageon
Limanda limanda	Limande	Dab
Oncorhynchus mykiss (Salmo gairdneri)	Truite Arc-en-ciel	Rainbow trout
Perca fluviatilis	Perche	Perch
Phoxinus phoxinus	Vairon	Minnow
Platichthys flesus	Flet	Flounder
Pleuronectes platessa	Plie	Plaice
Poecilia reticulata	Guppy	Guppy
Proposium williamsoni	Ménomini des montagnes	Mountain whitefish
Pseudopleuronectes americanus	Plie rouge d'Amérique	Winter flounder
Rutilus rutilus	Gardon	Roach
Salmo salar	Saumon atlantique	Atlantic salmon
Scardinius erythrophtalmus	Rotengle	Rudd
Scophthalmus maximus	Turbot	Turbot
Spirlinus bipunctatus	Spirlin	Spirlin
Stenotomus chrysops	Spare doré	Scup
Zoarces viviparus	Loquette	Blenny

Liste des abréviations

AChE : Acétylcholinestérase
ADN : Acide DéoxyriboNucléique
ADNc : ADN complémentaire
Ah : Récepteur Aryl hydrocarbon
AHH : Aryl Hydrocarbon Hydroxylase
ANOVA : Analyse de Variance
ARNm : Acide RiboNucléique messager
BaP : Benzo(a)Pyrène
bNF : beta-naphtoflavone
CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse
ECD : Détecteur à capture d'électrons (chromatographie en phase gazeuse)
ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
EROD : EthoxyRésorufine-O-Déethylase
FC : Facteur de Condition
FID : Détecteur à ionisation de flamme (chromatographie en phase gazeuse)
HAP : Hydrocarbure aromatique Polycyclique
HPLC : Chromatographie liquide haute performance
i.p. : injection intrapéritonéale
IBGN : Indice Biologique Global Normalisé
IC : Intervalle de Confiance
IOBS : Indice Oligochètes
LDA : Laboratoire Départemental d'Analyses
MD : Méthidathion
MES : Matières En Suspension
MG : Matière Grasse
NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
P450 : Cytochrome P450
PCB : Polychlorobiphényles
PCDD : Poly Chloro Dibenzo-p-Dioxine
PCDF : Poly Chloro Dibenzo Furane
PF : Poids Frais
PS : Poids Sec
QSAR : Quantitative Structure Activity Relationship
RGS : Rapport Gonado Somatique
RHP : Réseau Hydrobiologique et Piscicole
RHS : Rapport Hépato Somatique
RNB : Réseau National de Bassin
SM : Spectrométrie de masse
TCDD : Tetra Chloro Dibenzo-p-Dioxine
TEF : Toxic Equivalency Factor

Préambule

Ce travail concerne la mesure chez le poisson de l'induction du cytochrome P450 1A (quantifié en particulier par l'activité enzymatique EROD[1]) comme indicateur d'une réponse biologique des organismes aquatiques à des contaminants majeurs des écosystèmes. En milieu continental, ce biomarqueur s'est révélé pertinent pour évaluer l'impact sur le milieu de rejets de l'industrie papetière, ainsi que des PCB, HAP et dioxines (Andersson *et al.*, 1988 ; Van der Oost *et al.*, 1991 ; Van der Weiden *et al.*, 1993). Dans des situations moins caractérisées quant à la nature de la contamination[2], les auteurs ont également pu conclure à une relation positive entre la contamination chimique et la réponse de l'activité EROD.

Néanmoins, dans la mesure où cette réponse biochimique varie également avec certains facteurs biotiques et abiotiques[3], il est difficile d'interpréter (en terme d'exposition des poissons à des polluants) les niveaux d'activité EROD mesurés en une station lorsqu'il est impossible de trouver sur le même tronçon de rivière un lieu de pêche susceptible de servir de situation témoin. Par ailleurs, la variabilité due à ces facteurs, si elle n'est pas maîtrisée, peut sensiblement modifier la conclusion. Il reste ainsi à affiner d'une part cette mesure qui est soumise à des facteurs de variabilité (sexe, saison, espèce...), et d'autre part le diagnostic qui en découle quant à la contamination du milieu, en faisant la part des possibles phénomènes d'interaction et d'inhibition.

Les résultats de ce travail sont présentés successivement dans des articles en cours de publication ou en rédaction. Dans le corps principal du texte, les résultats sont synthétisés tout en faisant référence à ces articles (reproduits en annexe). Les parties pour lesquelles aucun article n'a été rédigé sont davantage détaillées.

---

[1] EROD = EthoxyRésorufine-O-Dééthylase.

[2] Aval de pollution chimique industrielle (Vindimian *et al.*, 1991), contamination agricole diffuse (Vindimian *et al.*, 1993).

[3] Espèce, lignée, âge, sexe, température, maturation sexuelle, régime alimentaire, agents antagonistes (Goksøyr et Förlin, 1992).

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 Introduction

Une bonne gestion des milieux aquatiques doit reposer sur des outils pertinents d'évaluation de l'intégrité des écosystèmes et de la santé des organismes vivants, mises à mal par l'accumulation dans l'environnement des produits de l'activité humaine. Parallèlement aux descripteurs chimiques, désormais utilisés dans les programmes de surveillance, les variables biologiques répondent particulièrement à ce souci, car, par nature, elles donnent un diagnostic intégré sur la qualité écologique de l'écosystème vivant ainsi que sur les phénomènes de bioaccumulation et de bioamplification (Lévêque, 1997). Les variables biologiques sont donc irremplaçables comme système de surveillance et d'alerte.

En fonction de la variable biologique retenue, la mesure sera le signe d'un effet plus ou moins irréversible et plus ou moins directement lié au polluant responsable. On peut ainsi choisir de s'intéresser à des réactions de défense précoces au niveau de l'organisme voire au niveau cellulaire ou subcellulaire lorsque le composé toxique interagit avec les composants fonctionnels de la cellule : enzymes, métabolites, membranes... où ce polluant va être pris en charge par les processus naturels de défense de l'organisme : biotransformation, élimination, bioaccumulation.

1.1.1 Bioindicateurs et biomarqueurs

La contamination chimique de l'environnement a fait l'objet d'analyses de plus en plus poussées ces dernières années. Si indispensables qu'elles soient, elles ne donnent pourtant généralement qu'une information, partielle et instantanée, sur les polluants extérieurs aux organismes (eau, sédiments, MES), mais rarement sur les polluants bioaccumulés ou sur leur biodisponibilité.

Parfois, une information biologique est ajoutée aux descripteurs chimiques. Il peut s'agir d'indices reposant sur l'étude d'effectifs de populations. Mais ces bioindicateurs sont délicats à relier à la présence de polluants, tant ils sont intégrateurs d'une multitude d'effets. On peut s'intéresser également à des indicateurs précoces et sensibles, aptes à fonder un diagnostic sur la qualité de l'écosystème et sur la nature et le degré de contamination. L'intérêt de cette approche, complémentaire, dans une volonté d'évaluer le risque pour l'écosystème, est de prévenir des dommages écologiques irréversibles sans attendre que la probabilité d'apparition de ces dégâts soit trop forte.

Les biomarqueurs sont de bons candidats. En effet, ce sont des indicateurs biochimiques, physiologiques ou histologiques d'exposition d'un organisme à des

contaminants (Huggett *et al.*, 1992). Par exemple, ils peuvent permettre de détecter l'exposition à des hydrocarbures, PCB, métaux, produits phytosanitaires...en mesurant des activités enzymatiques spécifiques ou en détectant l'expression des gènes impliqués.

Certains auteurs font une distinction entre les biomarqueurs d'exposition et les biomarqueurs d'effet. En fait, une telle terminologie est arbitraire, car tout biomarqueur s'inscrit dans un processus continu, du contact avec le polluant jusqu'aux effets sur l'organisme. Il est vrai cependant que, selon les biomarqueurs, un aspect sera plus évident que l'autre. L'exemple des adduits à l'ADN est un cas de biomarqueur intermédiaire entre exposition et effet. L'induction des enzymes de biotransformation, dont il est question dans ce travail, est souvent considérée comme biomarqueur d'exposition, tandis que la mesure d'une modification de la reproduction est un biomarqueur d'effet.

Par nature, au fur et à mesure que l'on gagne en pertinence écologique, on risque de perdre en sensibilité, spécificité et précision (Figure 1-1) (Rapport *et al.*, 1985 ; Adams, 1990). Mais plus les indicateurs sont sensibles et plus les risques de « faux positifs » sont élevés (Chapman, 1991).

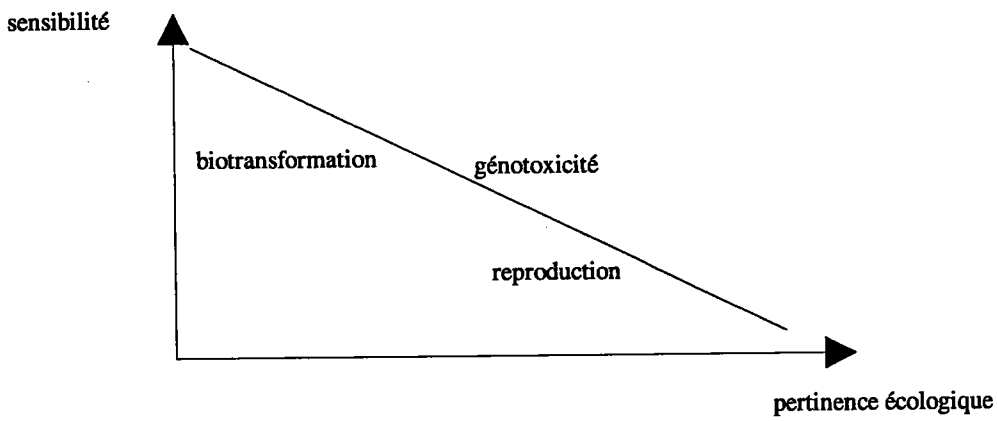


Figure 1-1. Pertinence écologique et sensibilité de biomarqueurs.

Ainsi, les biomarqueurs, de par leur spécificité et leur précocité, sont des outils de gestion à fort potentiel même si un travail important reste à faire sur leur valeur prédictive quant à des impacts au niveau des populations (Monod, 1997). Il apparaît que, dans l'état actuel des connaissances, il faille privilégier une combinaison biomarqueurs-bioindicateurs capable de déterminer en temps réel l'état de santé de l'organisme et des populations, de guider les efforts de restauration et d'évaluer les résultats de la gestion des milieux (Vindimian et Garric, 1992 ; Cormier et Daniel, 1994).

1.1.2 Le biomarqueur induction du cytochrome P450 1A

Parmi les approches de la toxicologie environnementale, l'étude des mécanismes biochimiques est particulièrement riche et a fait l'objet de nombreux travaux. En particulier, les mécanismes de biotransformation des polluants ainsi que les facteurs de modulation de ces mécanismes ont beaucoup été étudiés, tant au niveau des protéines qu'au niveau des gènes correspondants.

Le biomarqueur qui a été le plus étudié jusqu'à présent chez le poisson est certainement l'induction du cytochrome P450 1A. Les premières études effectuées *in situ* datent des années 70 (Payne et Penrose, 1975 ; Payne, 1976).

1.1.2.1 Biotransformation des xénobiotiques

Suite à une contamination du milieu aquatique, les polluants peuvent pénétrer à l'intérieur des organismes et y être distribués avant de s'accumuler au niveau de différents tissus et/ou exercer leur toxicité sur l'organe cible. Cependant, des systèmes biochimiques peuvent transformer ces polluants en produits qui pourront alors être éliminés plus facilement dans l'urine et la bile.

Les enzymes clef dans la première phase de biotransformation des xénobiotiques sont des enzymes monooxygénases à cytochrome P450[4], famille de protéines membranaires capables d'augmenter la solubilité des xénobiotiques qui sont ensuite conjugués puis excrétés dans l'urine et la bile (Lech *et al.*, 1982 ; Payne, 1984). Les réactions catalysées par les monooxygénases ajoutent un atome d'oxygène aux composés lipophiles.

On désigne par « induction » la synthèse *de novo* de nouvelles protéines P450 par l'organisme, entraînant une activité enzymatique accrue. Ce phénomène d'induction est particulièrement connu chez les mammifères mais il commence à être bien décrit chez les poissons et les plantes (Payne, 1984) et dans une moindre mesure chez les invertébrés (les mollusques notamment) (Stegeman et Hahn, 1994).

Chez les mammifères, des dizaines de formes de cytochrome P450 sont déjà connues. La nomenclature actuelle (Nebert *et al.*, 1991) les regroupe par famille sur la base des séquences en acides aminés. La famille 1A, induite par les HAP, PCB, dioxines, et caractérisée par l'activité EROD, est la plus étudiée chez les poissons (Stegeman et Hahn, 1994)[5]. Cette famille s'exprime principalement dans le foie mais aussi dans d'autres organes (Lester *et al.*, 1993).

---

[4] 450 par référence à la longueur d'onde d'absorption de la forme réduite après complexation avec le monoxyde de carbone.

[5] On la désigne par le symbolisme CYP1A.

1.1.2.2 Méthodes de quantification de l'induction du cytochrome P450 1A

L'induction est initiée par la liaison du xénobiotique à un récepteur cellulaire dit Ah[6] ce qui entraîne l'expression du gène, puis la transcription en ARNm et enfin la synthèse des protéines (Figure 1-2). Des mesures aux différentes étapes permettent de quantifier l'induction (Tableau 1-1).

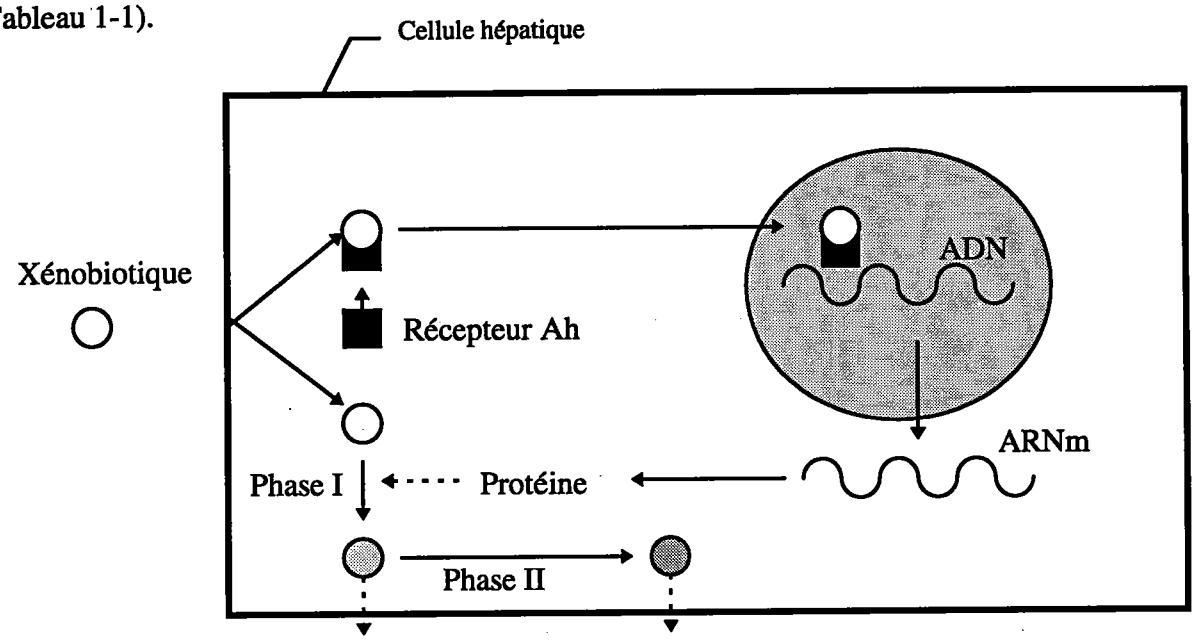


Figure 1-2. Etapes d'induction et de métabolisation de phase I et II (d'après Van der Oost et al., 1996a).

Tableau 1-1. Méthodes utilisées pour mesurer l'induction du cytochrome P450 1A (d'après Stegeman et al., 1992).

Paramètres mesurés	Réactifs spécifiques	Dosages classiques
Taux catalytique	7-Ethoxyrésorufine	EROD (fluorimétrie, spectrophotométrie)
	Benzo(a)Pyrène	AHH (fluorimétrie, radiométrie)
Protéines	anticorps	Western blot, ELISA[a]
ARNm	sondes : ADNc ou oligonucléotides	Immunohistochimie, in vitro translation, Dot blot, Northern blot

[a] Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay.

Historiquement, les activités enzymatiques ont d'abord été utilisées, puis avec la production d'anticorps spécifiques, les méthodes d'immunodétection se sont généralisées. En effet, les méthodes immunochimiques ont l'avantage de compléter l'information apportée par la mesure de l'activité enzymatique sur le niveau d'induction dans le poisson en particulier lorsque l'activité est inhibée par un polluant ou lors d'une mauvaise conservation des

[6] Aryl hydrocarbon.

échantillons. Depuis quelques années, la détection des ARNm, qui donne des informations sur les mécanismes de régulation de l'induction, est également utilisée.

Parmi les mesures classiques d'activités catalytiques, celle de l'activité EROD est la plus sensible (Stegeman *et al.*, 1987 ; Monod *et al.*, 1988 ; Di Giulio *et al.*, 1993 ; Ahokas *et al.*, 1994 ; Machala *et al.*, 1997).

Les études utilisant une détection immunochimique se sont multipliées plus récemment[7]. Un des gros avantages des techniques immunochimiques est leur robustesse vis-à-vis des modes de conservation des échantillons. En effet, la conservation de l'activité catalytique nécessite de grandes précautions (conservation à basse température, Förlin et Celander, 1993) alors que la non-destruction des épitopes antigéniques suffit à la reconnaissance de la protéine par l'anticorps. Ainsi, l'immunodétection ne souffre pas d'une conservation à -20°C tandis que les activités monooxygénases perdent la moitié de leur activité après 1 ou 2 jours à cette température (Lindström-Seppä et Hänninen, 1988). Enfin, l'induction reste mesurable même en présence de phénomènes d'inhibition de l'activité (Goksøyr et Förlin, 1992). Toutefois, dans le cas général, on observe une bonne concordance (bonnes corrélations statistiques) entre les mesures d'activité enzymatique et de détection immunochimique (ELISA) sur un certain nombre d'espèces (Collier *et al.*, 1992 ; Van der Weiden *et al.*, 1992).

L'augmentation en ARNm précède la synthèse de protéine et l'augmentation de l'activité enzymatique puis diminue avant les autres (Kloepper-Sams et Stegeman, 1989) (Figure 1-3). Cependant, dans le cas d'une exposition prolongée à un inducteur, les niveaux en ARNm peuvent rester élevés tandis que protéine et activité enzymatique diminuent (Haash *et al.*, 1993). Ces cinétiques sont dépendantes de la température de la réaction enzymatique (Kloepper-Sams et Stegeman, 1992).

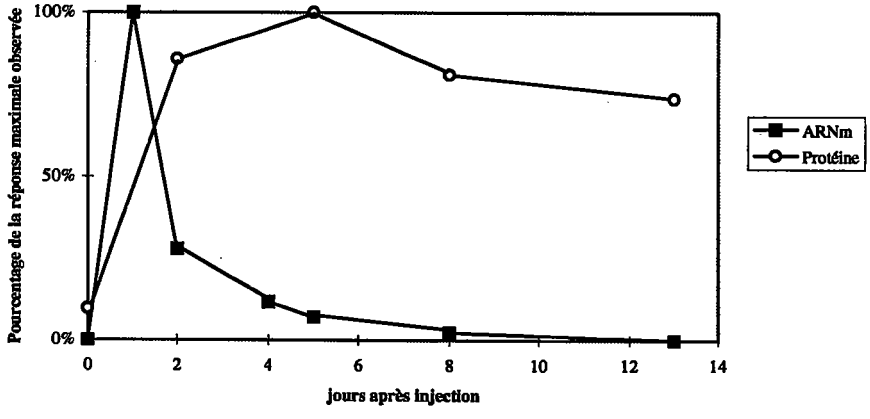


Figure 1-3. Comparaison des cinétiques d'apparition et de disparition d'ARNm et de protéine P450 1A après induction par la beta Naphtoflavone (d'après Kloepper-Sams et Stegeman 1989).

[7] Stegeman *et al.* (1987) réalisèrent une des premières études immunochimiques sur une espèce de poisson des eaux du Massachusetts.

1.1.2.3 Inducteurs du cytochrome P450 1A

L'induction du cytochrome P450 1A présente les deux caractéristiques suivantes : rapidité (délai de 2 à 5 jours après l'exposition) et réversibilité. Elle est également d'autant plus élevée que les concentrations en xénobiotiques inducteurs sont importantes[8].

L'induction du cytochrome P450 1A dans les foies de poissons peut ainsi indiquer l'exposition des organismes à des HAP (Hydrocarbures aromatiques polycycliques), PCB (Polychlorobiphényles), organochlorés (DDT, lindane...) tous potentiellement dangereux pour l'écosystème. Les principaux inducteurs connus ont été rassemblés dans le Tableau 1-2.

Tableau 1-2. Inducteurs du cytochrome P450 1A connus chez le poisson (d'après Stegeman et Hahn, 1994).

Composé	Activité	Protéine	ARNm	composé détecté dans l'environnement
betaNaphtoflavone (bNF)	+	+	+	non
3-MethylCholanthrène (3MC)	+	+	+	non
Benzo(a)Pyrène	+	+	NM	oui
Benzanthracène	+	NM	NM	oui
Dibenzanthracène	+	NM	NM	oui
Dimethylbenzanthracène	+	NM	NM	oui
PCB77	+	+	+	oui
PCB126	+	+	NM	oui
PCB169	+	+	NM	oui
PCB118	+/-	+/-	-	oui
2,3,7,8 TCDD	+	NM	NM	oui
2,3,7,8 TCDF	+	+	+	oui
2,3,4,7,8 PCDF	+	NM	NM	oui
Isosafrole	+	+	NM	non
Butoxyde de pyperonyl	+	NM	NM	non

NM : absence de données ; + : effet inducteur ; - : pas d'effet.

Les HAP sont issus de la combustion incomplète de composés organiques que ce soit d'origine naturelle (feux de forêt...) ou anthropique (tabac, cheminées, centrales thermiques...). Emis dans l'atmosphère, ils se retrouvent dans les sols et les sédiments. Les HAP peuvent provoquer cancérogenèse et immunotoxicité (Davila *et al.*, 1997).

[8] Hormis pour de très fortes concentrations.

Les PCB ont été retenus par l'industrie au début du siècle pour leurs propriétés remarquables (thermiques, thermodynamiques, chimiques, électriques...) qui leur confèrent une très grande stabilité. Ainsi, malgré l'interdiction de la production dans les années 1970 (Poland et Knutson, 1982), ils persistent dans les écosystèmes à de fortes concentrations en se concentrant le long de la chaîne alimentaire (jusqu'au lait maternel) (Broadbank, 1991).

Les polychloro dibenzofuranes (PCDF) et polychloro dibenzo-p-dioxines (PCDD, par exemple la dioxine ou 2,3,7,8 TCDD) ne sont pas des produits de synthèse mais on les retrouve comme impuretés de fabrication (chlorophénols notamment) ou de transformation d'autres produits (Poland et Knutson, 1982).

Comme chez les mammifères, l'existence du récepteur Ah a été démontrée chez le poisson (Hahn *et al.*, 1992). L'induction serait ainsi réservée à des substances dont la structure chimique est physiquement compatible avec la conformation du récepteur : molécule plane dont la largeur et la longueur sont d'environ 3 et 10 Å (Poland et Knutson, 1982). Ainsi le caractère inducteur des HAP et PCB dépend de la coplanarité des cycles aromatiques et des atomes de chlore. Par exemple, seuls 6 des 209 congénères PCB sont reconnus comme inducteurs. Le composé 2,3,7,8-TCDF est inducteur tandis que le composé 2,3,6,8-TCDF ne l'est pas (Hahn *et al.*, 1989 ; Hahn et Stegeman, 1990).

Des études de relations structures-activités (QSAR) ont montré les similitudes de réactivité enzymatique pour des substrats ou inducteurs de structures chimiques, planarité, liaisons Carbone-Hydrogène comparables (Chan et Hollebone, 1995 ; Hollebone *et al.*, 1995).

Une voie commode de standardisation et de diagnostic rapide du caractère inducteur d'une substance ou d'un échantillon est l'usage de tests *in vitro* sur cultures cellulaires (Clemons *et al.*, 1994 ; Pesonen et Andersson, 1997). Ces méthodes permettent en effet de comparer à la dioxine, le caractère inducteur de molécules (calcul du Toxic Equivalency Factor, TEF, Newsted *et al.*, 1995) (Tableau 1-3) ou de mélanges complexes (sédiment) et d'extraits d'échantillons par l'étude des fractions chimiques (Burnison *et al.*, 1996).

Tableau 1-3. Facteurs de toxicité en équivalent 2,3,7,8 TCDD pour les PCB (d'après Safe, 1990).

Congénères	TEF
PCB 126	0,1
PCB 169	0,05
PCB 77	0,01
Mono ortho coplanaires	0,001
Di ortho coplanaires	0,00002

1.1.2.4 Inhibiteurs du cytochrome P450 1A

Cependant, des phénomènes d'inhibition peuvent intervenir aux différents niveaux des processus conduisant à une activité enzymatique normale. Un inhibiteur peut ainsi agir spécifiquement en interagissant avec l'enzyme, diminuant ainsi l'activité catalytique, mais aussi en exerçant une toxicité non spécifique (diminution de la synthèse des protéines, de l'hème...) (Testa et Jenner, 1981 ; Ortiz de Montellano et Reich, 1986). Par exemple, les métaux lourds font partie de ce deuxième type d'inhibiteurs. L'inhibition peut être réversible (inhibiteurs compétitifs) ou irréversible, car due à des «substrats suicides ». Ce dernier cas d'inhibition de l'enzyme par liaison covalente peut nécessiter une activation métabolique préalable (cas des organophosphorés, isosafrole, butoxyde de piperonyl...)(Figure 1-4).

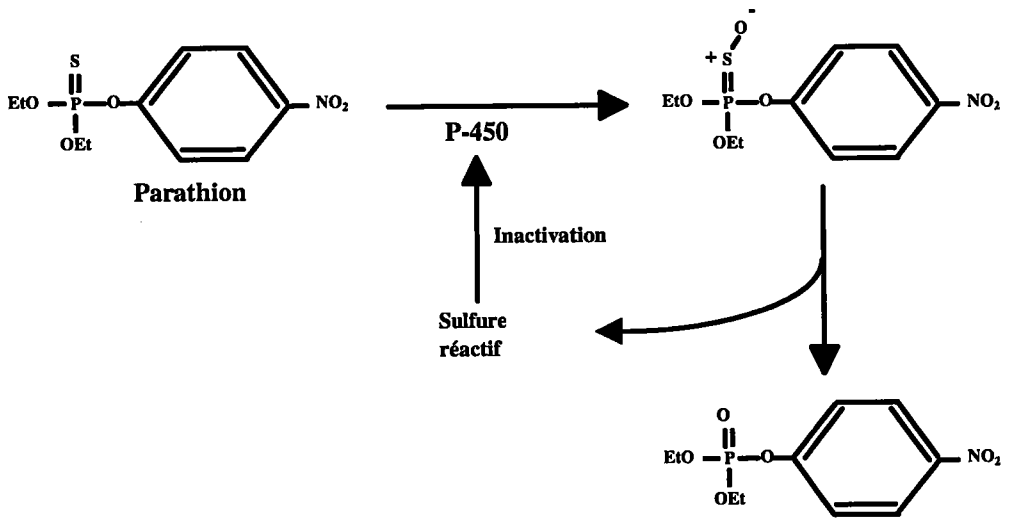


Figure 1-4. Inhibition par le Parathion (d'après Ortiz de Montellano et Reich, 1986).

Certains inducteurs (bNF, BaP) sont aussi des inhibiteurs à des doses plus élevées alors même que les niveaux en protéine ou ARNm restent élevés. Sur le terrain, un tel phénomène a été observé dans des sites très contaminés par les PCB ou des effluents de papeterie (Lindström-Seppä et Oikari, 1990).

Tableau 1-4. Inhibiteurs des activités monooxygénases connus chez le poisson (d'après Stegeman et Hahn, 1994 ; Bucheli et Fent, 1995).

Composé	Activité	*in vivo/vitro*	Mécanisme
alpha-Naphtoflavone	AHH, EROD	*in vitro*	compétition
bNF (à dose élevée)	EROD	*in vivo/in vitro*	compétition
Naphtalène aminotriazole	AHH, EROD	*in vitro*	inactivation
Aminobenzotriazole	EROD	*in vitro*	inactivation
Metyrapone	AHH	*in vitro*	?
Butoxyde de piperonyl	EROD	*in vivo*	?
BaP (à dose élevée)	AHH, EROD	*in vivo/in vitro*	compétition
Naphtalène	AHH	*in vivo/in vitro*	?
Benzène	EROD	*in vivo*	?
3,3',4,4'-TCB	AHH, EROD	*in vivo/in vitro*	compétition
3,3',4,4',5,5'-HCB	AHH	*in vivo*	?
Cadmium	EROD	*in vivo*	?
Tributyl étain	EROD	*in vivo/in vitro*	?
MS-222	AHH, EROD	*in vivo/in vitro*	?
SKF-525A	AHH	*in vitro*	?
Phénobarbital	plusieurs	*in vivo*	?
Acrylamide	EROD	*in vivo*	?
Arsenite	EROD	*in vivo*	?
Triphényl étain	EROD	*in vitro*	?

1.1.2.5 Facteurs de modulation de l'induction du cytochrome P450 1A

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, les activités biochimiques, dont l'EROD, sont soumises à l'influence de nombreux autres facteurs (espèce, âge, sexe, maturation sexuelle, régime alimentaire, agents antagonistes, température) (Goksøyr et Förlin, 1992) dont il faut connaître avec précision les influences afin d'interpréter correctement les niveaux du biomarqueur EROD mesuré sur des poissons prélevés dans le milieu. Ces facteurs sont détaillés dans l'article 1.

Le Tableau 1-5 (page suivante) indique les ordres de grandeur de l'influence de ces facteurs sur l'induction. Les valeurs d'influence supérieures à 1 indiquent qu'une « augmentation » du facteur entraîne une augmentation de l'induction (c'est le cas pour inducteur et température notamment). En revanche, les valeurs inférieures à 1 indiquent un effet inhibiteur du facteur (inhibiteur, maturité sexuelle des femelles...). Ainsi, les effets de l'espèce, de l'inducteur, de la maturité sexuelle apparaissent en général prépondérants par rapport aux effets de l'âge, de la température et de l'alimentation.

Tableau 1-5. Ordre de grandeur de l'influence des facteurs connus de modulation.
En facteur d'induction toutes choses égales par ailleurs. Sauf mention contraire, il s'agit de résultats de laboratoire.

Facteur	Ordre de grandeur de l'effet du facteur sur l'induction	Référence
Espèce	50	Förlin et Celander, 1993
	60	Addison *et al.*, 1991
Maturité sexuelle des femelles	femelle-mâle : 0,10 (truite)	Förlin et Haux, 1990
	femelle-mâle : 0,14 (spare doré)	Snowberger Gray *et al.*, 1991
	femelle-mâle : 0,25 (saumon)	Larsen *et al.*, 1992
Age	larve-juvénile : 20 (turbot)	Peters et Livingstone, 1995
	juvénile-adulte : 1 (turbot)	Peters et Livingstone, 1995
Température	5-17°C : 1,5	Andersson et Koivusaari, 1985
	6-16°C : 2	Kloepper-Sams et Stegeman, 1992
	10-20°C : 0,3 (terrain)	Sleiderink *et al.*, 1995
	15-20°C : 1,5	Eggens *et al.*, 1996
Alimentation	pas nourri-nourri : 2	Jimenez *et al.*, 1988
	pas nourri-nourri : 2	Ankley et Blazer, 1988
Inducteur	283 (truite)	Förlin et Celander, 1993
	6 (carpe)	Melancon *et al.*, 1981
Inhibiteur (cas du cuivre)	0,27	Stien *et al.*, 1997
	0,39	Flammarion *et al.*, 1996

1.1.2.6 Effets biologiques associés à l'induction

La question de la signification biologique de l'induction est débattue et reste un champ de recherche très ouvert (Stegeman et Hahn, 1994) : s'il est clair que l'induction est le signe d'une exposition et d'une biotransformation en vue de l'excrétion, les liens de cause à effet avec une toxicité sont moins évidents.

Ainsi, l'activation de nombreux procarcinogènes est soumise à l'action catalytique préalable des monooxygénases à cytochrome P450 (Lech *et al.*, 1982 ; Payne, 1984 ; Ioannides et Parke, 1993) qui les transforment en métabolites réactifs capables d'interagir avec l'ADN ce qui entraîne l'activation d'oncogènes et l'initiation génotoxique. Par exemple, chez *Ameiurius nebulosus*, le 2-aminoanthracène est activé *in vitro* et *in vivo* entraînant des adduits à l'ADN (Watson et Di Giulio, 1997). Chez la truite, il a été montré que le niveau EROD est représentatif d'un potentiel d'activation du BaP en d'autres métabolites réactifs vis-à-vis de l'ADN (Masfaraud, 1992). Il a ainsi été suggéré l'existence d'un seuil d'induction au delà duquel le niveau de l'activité EROD serait susceptible de refléter le degré d'altération de l'ADN (Masfaraud, 1992). Cependant, les mécanismes de réparation de l'ADN ainsi que les mécanismes de biotransformation de phase II (enzymes de conjugaison) permettent de réduire ce risque.

La détermination immunohistochimique de l'induction du cytochrome P450 1A dans différents types cellulaires permet de faire le lien entre l'induction et la présence de lésions prénéoplasiques, dues à la présence de composés inducteurs. Cette méthode présente l'avantage de préserver la structure cellulaire ; elle peut donc donner des informations sur les cellules cibles ainsi que sur les mécanismes de l'induction (Husoy *et al.*, 1996). Köhler et Pluta (1995) conseillent de faire un diagnostic histologique du foie parallèlement à la mesure de l'induction. Ils notent en effet qu'en cas de dégénérescence hépatique l'activité EROD peut être inhibée. Cette observation est confirmée par Van Veld *et al.* (1992) qui notent des lésions observées dans des hépatocytes de *Fundulus heteroclitus* concomitantes à des activités EROD et des niveaux en P450 1A moindres malgré la présence de HAP.

Par ailleurs, la modulation de certaines formes de Glutathion-S-Transférases (GST), UDP Glucuronyl Transférases et Retinol AcetylTransférases est sous contrôle du mécanisme de transduction Ah. L'induction de ces enzymes peut alors entraîner une baisse des composés essentiels pour le métabolisme et provoquer, par exemple, une dégénérescence rétinéenne (Jensen *et al.*, 1987 ; Branchaud *et al.*, 1995). Ces observations ont toutefois été contredites : chez *Platichthys flesus* exposés durant 7 jours à de la dioxine (100 µg/kg), malgré un taux d'induction élevé, aucun effet rétinéen n'a été observé (Besselink *et al.*, 1997).

D'autre part, l'induction du cytochrome P450 1A chez des poissons sexuellement matures pourrait provoquer des effets sur la reproduction. Ainsi, il a été observé une baisse de la synthèse de la vitellogénine concomitante avec l'induction *in vitro* par la dioxine (Figure 1-5). Une diminution de vitellogénine dans le foie pourrait alors avoir des conséquences sur l'efficacité de la reproduction (Anderson *et al.*, 1996). Une autre hypothèse a également été avancée : l'induction augmenterait la métabolisation du 17β-oestradiol ce qui expliquerait la baisse des concentrations en 17β-oestradiol observée *in situ* chez des femelles dont l'activité EROD est induite (Förlin et Haux, 1990 ; Munkittrick *et al.*, 1994).

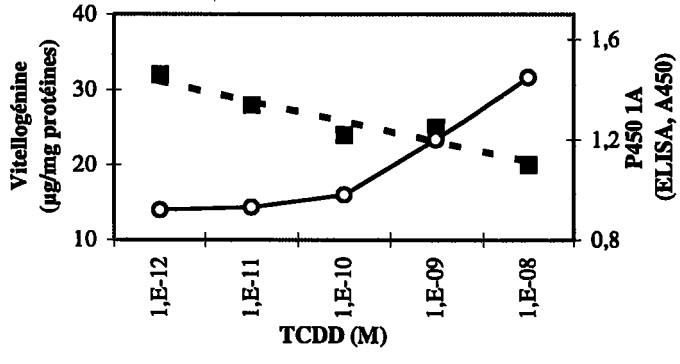


Figure 1-5. Effet de la dioxine sur la synthèse de vitellogénine et l'induction de cytochrome P450 1A dans des cellules hépatiques de truite arc-en-ciel exposées à 0,22µM de 17β-oestradiol (48h) (d'après Anderson et al., 1996).

La réelle signification de l'induction, en tant qu'indicateur d'effet toxique, est débattue. En effet, et nous l'avons vu ci-dessus, si cette réponse est en général bien liée à l'exposition à des inducteurs, cette réaction d'adaptation n'entraîne pas nécessairement des effets irréversibles. 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 *et al.*, 1990 ; Calow, 1991).

1.1.3 Exemples d'utilisation de la mesure de l'induction du cytochrome P450 1A chez les poissons

Depuis une vingtaine d'années, la mesure d'activités monooxygénases, pour identifier des zones de pollutions dans l'environnement aquatique, a été largement utilisée. Des inductions élevées dans les foies de poisson ont été observées au niveau de zones affectées par des déversements de pétrole (Payne et Penrose, 1975 ; Davies *et al.*, 1984) ou par certains effluents d'usines (papeteries, usines d'incinération de PCB...) (Lindström-Seppä et Oikari, 1988 ; Monod *et al.*, 1988). Un certain nombre d'études ont concerné les zones côtières américaines (Stegeman *et al.*, 1987) ou françaises (Lafaurie *et al.*, 1989 ; Galgani *et al.*, 1991 ; Narbonne *et al.*, 1991). Après plusieurs années d'expérimentation, l'activité EROD est actuellement envisagée comme outil de biosurveillance au sein du Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin, le RNO, par l'IFREMER. Au niveau européen, ce biomarqueur fait partie de la batterie de méthodes en cours de validation méthodologique dans le cadre du projet « BIOlogical MARkers of environmental contamination in marine ecosystem » (BIOMAR).

Des synthèses bibliographiques témoignent de l'étendue des études réalisées (Payne *et al.* 1987 ; Goksøyr et Forlin, 1992 ; Stegeman *et al.*, 1992 ; Bucheli et Fent, 1995). On trouvera d'autres exemples en eaux douces en annexe (article 1). En particulier, le Cemagref a l'expérience de l'utilisation de ce biomarqueur dans des études ponctuelles (i.e. par rivière) sur la Durance et sur l'Ardières.

Le long de la Durance, la comparaison des activités EROD de cyprinidés pêchés en zones amont avec les niveaux mesurés à l'aval d'une usine chimique a mis en évidence un gradient décroissant d'induction visible au fur et à mesure que l'on s'éloigne de l'usine et jusqu'à 30 km en aval (Vindimian *et al.*, 1991 ; Richert, 1994). L'induction est maximale pour les trois espèces[9] à la station la plus proche de l'usine. Ensuite, les profils d'induction par espèce se différencient. Ce travail a confirmé l'importance de bien prendre en compte l'influence de l'espèce, de la maturité sexuelle, des polluants bioaccumulés et de mieux quantifier leurs influences respectives. Si dans les cas de forte contamination, l'augmentation de l'induction est en général suffisante pour décrire les situations de pollution, dans des cas

[9] Barbeau, chevaine et hotu.

plus nuancés, la variabilité provoquée par ces facteurs, si elle n'est pas maîtrisée, pourrait sensiblement modifier les diagnostics environnementaux proposés.

Des résultats moins contrastés ont été obtenus sur l'Ardières, une rivière qui draine un bassin viticole du Beaujolais et qui est largement polluée par les produits phytosanitaires (Vindimian *et al.*, 1993 ; Richert, 1994). La quantité importante de métaux et de mélanges de produits phytosanitaires est certainement à l'origine de réponses délicates à interpréter. D'autre part, la validité de la station amont, qui présente des niveaux EROD supérieurs aux stations amont de la Durance, pourrait également être remise en question. Ainsi, pour interpréter correctement les résultats d'activités EROD de poissons pour lesquels des valeurs ne sont pas disponibles pour l'amont, on pourrait se reporter à des valeurs obtenues dans des sites de référence (non pollués) avec les mêmes espèces de poissons, le même sexe, la même saison.

1.1.4 Référence et perturbation

L'intérêt de la mesure de l'activité EROD a ainsi largement été montrée dans le cas d'études ponctuelles (amont-aval) ou de profil de rivière. Cette connaissance « relative »[10] pourrait être généralisée grâce à l'étude spécifique de sites témoins afin de déterminer des plages naturelles de variations de l'activité EROD qui seraient valables pour un ou plusieurs bassins fluviaux. En supposant qu'un tel projet soit réalisable, il s'agirait par la suite de quantifier l'induction en relation avec une quantité d'inducteurs (en prenant en compte les facteurs biologiques de variabilité) et d'estimer la plage de variation de l'induction. Cela permettrait de situer les résultats les uns par rapport aux autres sur une même échelle entre le « zéro » (niveau naturel) et le maximum.

Une telle approche a été conseillée par Mayer *et al.* (1992) afin d'augmenter les facilités d'application d'un biomarqueur en routine et de diminuer les risques de faux négatifs ou de faux positifs.

1.1.4.1 Définition de conditions de référence

En ce qui concerne les monooxygénases, peu d'auteurs se sont intéressés à étudier spécifiquement les niveaux d'activité en sites non pollués (Lindström-Seppä et Oikari, 1990 ; Balk *et al.*, 1996). On peut effectivement se poser la question de l'existence d'une référence absolue ou d'une référence pragmatique. Il n'est pas illusoire d'obtenir le premier type de référence pour des contaminations en produits chimiques de synthèse qui n'existent pas à l'état naturel[11], mais ce n'est pas le cas pour les métaux[12] ou des variables biologiques. A

[10] Relative car en différentiel d'induction par rapport au site témoin qu'il soit l'amont proche ou l'amont de la rivière.

[11] La référence est alors égale à 0 (aux incertitudes de mesure près).

[12] Présents naturellement dans les sédiments.

moins de disposer d'études théoriques (modélisation), il s'agira alors de fournir un effort important d'échantillonnage. Or, dans le cas particulier de la mesure de l'activité EROD, les espèces de poissons susceptibles d'être pêchées en sites pollués sont des espèces qu'il est difficile d'échantillonner en sites non anthropisés[13]. La recherche de référence pragmatique pour une espèce de poisson se restreint alors en une recherche optimisée de sites présentant le moins possible de perturbations anthropiques polluantes et où l'espèce choisie est présente.

Les difficultés sont alors de trois ordres : théoriques, régionales et statistiques.

A l'instar des fluctuations naturelles des écosystèmes (Blandin et Lamotte, 1985), il n'est pas à exclure que les valeurs de référence d'un biomarqueur se déduisent de la succession périodique d'états dans un domaine de fluctuation plutôt que d'une référence stable dans le temps.

D'autre part, les variations naturelles d'une région à une autre ou d'une rivière à une autre peuvent être importantes selon la variable biologique considérée. Une référence absolue risque donc d'être peu précise et même de prôner à son insu une dégradation si elle est trop laxiste pour couvrir tout un territoire ou dans le cas contraire, trop exigeante pour être réaliste. Certains auteurs conseillent donc une référence régionalisée (Wasson, 1997), tant il serait erroné d'appliquer une même grille de référence à l'échelle d'un pays.

Enfin, pour définir une référence avec valeur moyenne et plage de variation, il s'agit de bien cerner le système et de séparer les changements dus à un stress, des changements naturels, grâce à des descripteurs tant chimiques que biologiques. Ce discernement contient une part d'arbitraire. En effet, une référence basée sur des moyennes statistiques dépend des variabilités connues et de l'état actuel de la connaissance (Pickett *et al.*, 1989). Des échantillonnages effectués sur plusieurs années sont nécessaires pour discriminer les stress naturels des stress anthropiques (Schindler, 1987 ; Rapport, 1992).

1.1.4.2 Détection d'une perturbation

Après une légère perturbation, un écosystème peut en général retrouver son équilibre et son intégrité, mais, lorsque la perturbation est trop forte, l'écosystème est dégradé. En toxicologie, ce concept est connu et se traduit par trois étapes :

1. homéostasie : un changement de concentration n'entraîne pas de variation dans la réponse.
2. adaptation : accroissement de réponse.
3. pathologie : le système est débordé.

Pour un biomarqueur, la première étape correspond à la plage de variation de référence[14], la deuxième à la relation dose d'inducteur-réponse et la troisième étape

---

[13] On trouve en effet plus facilement des cyprinidés que des salmonidés en sites pollués.

[14] Où d'éventuelles contaminations chimiques n'entraînent pas de modification du biomarqueur.

correspond au niveau à partir duquel la réponse est saturée ou ne peut plus s'exprimer en raison d'une toxicité non spécifique.

Il s'agit donc de trouver les « bonnes » variables statistiques décrivant le biomarqueur sur des critères distributionnels afin d'en déduire une distance statistique adéquate qui permettra de distinguer la deuxième étape de la première et de quantifier l'intensité de la perturbation (Suter, 1993). Cette distance pourra aussi être reliée aux facteurs chimiques[15] de variabilité (inducteurs et inhibiteurs). Dans la mesure du possible, le facteur temps (durée et fréquence de l'intensité de l'exposition) devrait être pris en compte.

1.2 Objectifs

Dans le bassin du Rhône, on ne dispose pas de données d'activité EROD susceptibles de servir de valeurs de référence pertinentes pour les espèces communes de la famille des Cyprinidés, ni de quantification, sur ces mêmes espèces, de l'influence des facteurs environnementaux (maturation sexuelle...) ou chimiques (inducteurs ou inhibiteurs). Ce préalable méthodologique est indispensable à toute utilisation de ce biomarqueur dans une démarche de suivi environnemental.

Une première étape consistera donc à quantifier en sites considérés comme pas ou peu pollués (sites de référence) les niveaux d'activité EROD ainsi que l'influence des facteurs naturels de variabilité (sexe, espèce, saison...).

Dans une deuxième phase, il s'agira d'améliorer l'interprétation de la mesure en réalisant (en site pollué ou non et en laboratoire) une hiérarchisation et quantification des variabilités, une interprétation des phénomènes d'induction et d'inhibition et une étude de la sensibilité de l'induction (inductibilité et réversibilité).

Enfin, après avoir pris en compte l'ensemble de ces informations, ce biomarqueur devra être resitué par rapport à des données chimiques ou biologiques connues sur les mêmes sites et des recommandations quant à la mesure de l'induction de l'EROD et son interprétation pourront être proposées.

1.3 Méthodologie

Afin de répondre à ces objectifs, des cyprinidés ont été échantillonnés dans le bassin du Rhône : Ain, Ardèche, Drôme, Saône et Rhône. Les trois premiers sites sont peu contaminés tandis que les sites de la Saône et du Rhône sont pollués par des contaminants d'origine agricole et industrielle. L'ensemble de ces sites fournit ainsi une typologie convenable et représentative. En plus de la mesure de l'induction du cytochrome P450 1A ont

[15] Toutefois, il faut garder à l'esprit qu'on ne sait doser correctement qu'une partie des contaminants et qu'on n'a donc qu'une idée imprécise de l'exposition du poisson.

été évalués la maturité sexuelle et les contaminants bioaccumulés afin de prendre en compte les deux facteurs prépondérants de modulation de l'induction. Des paramètres simples de condition du poisson ont aussi été mesurés. Le dosage des contaminants dans les sédiments et dans les muscles de poisson a été effectué respectivement par échantillonnages annuels et semestriels.

La difficulté de prendre en compte l'influence du facteur temps (histoire du poisson et de la contamination avant l'échantillonnage) dans le cadre des études de terrain nous a poussés à conduire des expérimentations de laboratoire sur le goujon, qui présente par ailleurs l'intérêt d'être une espèce commune dans les sites étudiés.

A l'occasion de ces études de laboratoire, l'évaluation de l'intérêt de la détection immunochimique a été menée dans le cas de l'exposition des goujons à un organophosphoré. La comparaison des résultats de cette méthode avec ceux de la mesure de l'activité EROD dans le cas des études de terrain a aussi été effectuée.

L'étude statistique a permis de comparer les sites et de les situer les uns par rapport aux autres. L'opportunité de la mesure conjointe de paramètres sanitaires (parasites...) et d'une évaluation de l'impact génotoxique nous a permis de comparer la mesure de l'induction du cytochrome P450 1A avec d'autres variables biologiques. Enfin, la synthèse de l'ensemble de ces données fournit des pistes en vue de l'utilisation en routine d'un tel biomarqueur dans les eaux continentales.

1.4 Organisation des travaux et de leur valorisation

En annexe ont été rassemblées les publications relatives à ce travail, à l'exception des rapports techniques. Les résultats sont ainsi décrits dans l'ordre suivant qui correspond à la logique des objectifs. Dans le corps du texte (chapitre 3) les résultats sont synthétisés avec le souci de ne pas reprendre dans le détail ce qui est dans les publications mais d'y apporter des informations complémentaires.

Un premier article (article 1)[16] reprend un certain nombre de connaissances et d'études réalisées en milieu continental avec la mesure de l'induction du cytochrome P450 1A. Après quelques aspects sur les bioindicateurs et biomarqueurs, un deuxième article (article 2)[17] reprend et résume les résultats de la mesure de l'activité EROD chez des cyprinidés de deux rivières : la Durance et la Moselle (données Cemagref, 1991 et 1992). Ces deux premiers articles font donc le point sur la mesure de l'induction du cytochrome P450 1A comme biomarqueur chez les poissons, sur les acquis et les points à développer : variabilité naturelle,

---

[16] FLAMMARION P., GARRIC J. et G. MONOD (1997) Utilisation de l'activité enzymatique EROD chez les poissons des hydrosystèmes continentaux, *in* LAGADIC L., CAQUET T., AMIARD J.C. et F. RAMADE (eds.) *"Utilisation des biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement"* Tec & Doc Lavoisier, Paris, 57-75.

[17] FLAMMARION P. et J. GARRIC (1996) Qualité des milieux aquatiques continentaux : intérêts de l'utilisation d'un marqueur biochimique chez le poisson. *La Houille Blanche*, N°5, 19-24.

intercalibration de la mesure entre laboratoires, difficultés d'interprétation, liens avec d'autres variables biologiques. Ils ont ainsi permis d'expliciter les objectifs de ce travail.

L'article 3[18] étudie la faisabilité de l'établissement de valeurs de référence de l'activité EROD pour trois espèces de cyprinidés prélevées dans quatre rivières du bassin du Rhône. Il confirme la nécessité de prendre en compte les facteurs espèce et maturité sexuelle même en l'absence de pollution. Des niveaux d'activités EROD pour ces sites témoins sont proposés.

L'article 4[19] propose, à partir des activités EROD des sites pollués ou non du bassin du Rhône, une transformation logarithmique des données afin de mieux positionner les résultats les uns par rapport aux autres. Sur le chevaine, l'influence de la maturité sexuelle est quantifiée quel que soit le niveau d'induction. D'autre part, on observe une corrélation entre l'induction et les niveaux en PCB bioaccumulés dans les muscles de chevaine.

Les influences du niveau d'inducteur et de la maturité sexuelle ont également été quantifiées chez le goujon en laboratoire (article 5[20]). Cet article prend en compte le facteur temps sur l'inductibilité de l'EROD avec l'étude de l'influence d'une exposition préalable du poisson aux inducteurs, ainsi que la réversibilité de l'induction.

Après avoir vérifié la possibilité de la détection immunochimique sur les trois espèces étudiées, nous avons abordé les phénomènes d'inhibition de l'activité EROD par des métaux ou des produits phytosanitaires. L'article 6[21] rend compte de l'inhibition par le cuivre et le méthidathion (organophosphoré) de l'activité EROD de truitelles soumises à des concentrations observées dans le milieu naturel. Ces conclusions sont complétées par l'article 7[22] qui, sur le goujon, rend compte de l'intérêt de la mesure immunochimique dans le cas d'une exposition au méthidathion.

Enfin, l'article 8[23] est le fruit d'une collaboration avec A. Devaux de l'INRA. Il s'agit d'une étude concernant l'évaluation génotoxique de polluants par l'utilisation de l'essai Comète (Devaux *et al.*, 1997) en complément à la mesure de l'activité l'EROD. Des résultats de terrain et de laboratoire sur des chevaines de l'Ain et du Rhône sont présentés.

---

[18] FLAMMARION P. et J. GARRIC (1997) Cyprinids EROD activities in low contaminated rivers : a relevant statistical approach to estimate reference levels for EROD biomarker ? *Chemosphere*, 35, 10, 2375-2388.

[19] FLAMMARION P., MIGEON B. et J. GARRIC. Statistical analysis of cyprinids EROD data in a large French watershed. *Ecotoxicology and Environmental Safety, sous presse.*

[20] FLAMMARION P., FORTIER V., MIGEON B., MORFIN P. et J. GARRIC. Variabilities in Cytochrome P450 1A induction in gudgeon (*Gobio gobio*) as a field and laboratory fish species. *Environmental Toxicology and Chemistry, Soumis.*

[21] FLAMMARION P., MIGEON B. et J. GARRIC (1996) Joint effects of copper sulphate and methidathion on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) EROD and AChE activities. *The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 56, 3, 440-445.

[22] FLAMMARION P., MIGEON B., URIOS S., MORFIN P. et J. GARRIC. Effect of Methidathion on the cytochrome P450 1A in the cyprinid fish gudgeon (*Gobio gobio*). *Aquatic Toxicology, Soumis.*

[23] DEVAUX A., FLAMMARION P., BERNARDON V., GARRIC J. et G. MONOD. Monitoring of the chemical pollution of the river Rhône through measurement of DNA damage and cytochrome P4501A induction in chub (*Leuciscus cephalus*). *Marine Environmental Research, sous presse.*

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Démarche expérimentale

La démarche suivante a été retenue (Figure 2-1) :

- Choix de sites de référence et de sites pollués.
- Pêches électriques à deux saisons (dont la saison de reproduction), avec prélèvement d'au moins dix individus par espèce et par sexe (femelle, mâle, juvénile[24]).
- Prélèvement de foie pour dosage EROD au laboratoire par une méthode fluorimétrique sur microplaque.
- Evaluation des contaminations en micropolluants métalliques et organiques des sédiments fins et muscles de poissons.
- Dans certains cas[25], utilisation complémentaire de la détection immunochimique.
- En complément, expérimentations en laboratoire en situation contrôlée (inducteurs et inhibiteurs connus, temps d'exposition ajustable) sur des cyprinidés de pisciculture ou de sites pollués ou non.

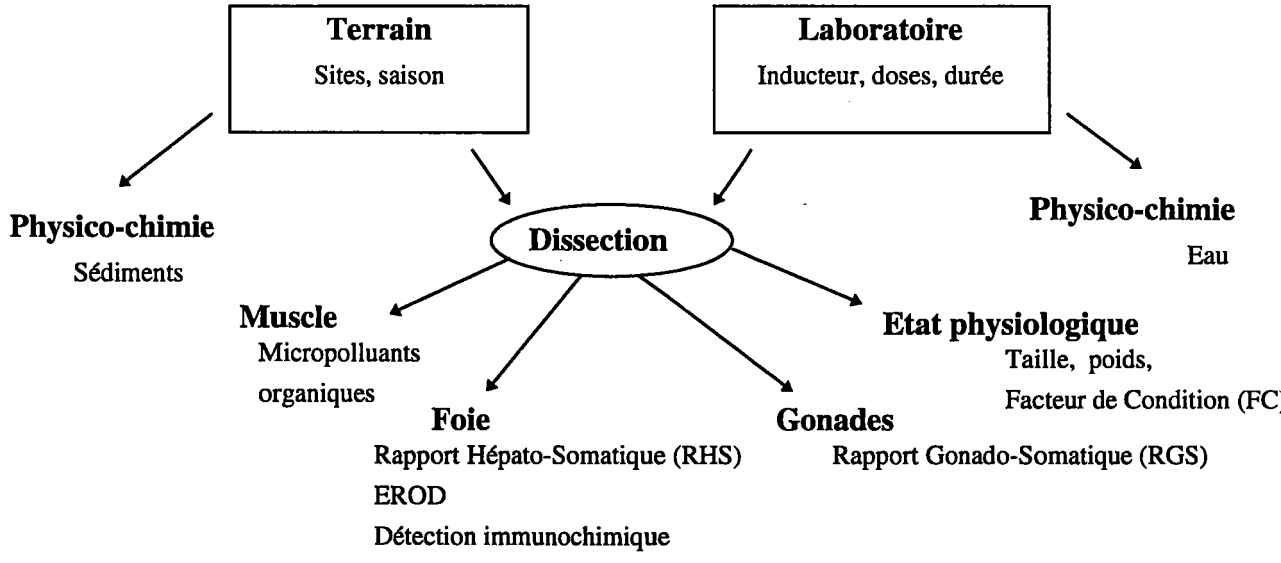


Figure 2-1. Schéma expérimental et descripteurs retenus.

[24] Au sens de poisson immature sexuellement.

[25] En cas d'inhibition notamment.

2.1.1 Sur le terrain

Les poissons (10 femelles, 10 mâles et 10 juvéniles) 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 par une épuisette.

Les poissons sont ensuite sacrifiés, mesurés, pesés, et sexés. Les poids des gonades sont notés ainsi que la présence de parasites. Les foies sont pesés et homogénéisés (tampon phosphate glycérol 20%) dans un potter et congelés dans l'azote liquide avant d'être conservés à -80°C. Une quantité de 10 à 50 grammes de muscle est prélevée puis congelée à -20°C.

Les données relatives à la température, conductivité, pH, oxygène, débit du cours d'eau sont soigneusement notées.

2.1.2 En laboratoire

Les poissons sont acclimatés durant deux semaines au moins avant toute expérience (sauf pour quelques cas particuliers d'expériences) dans des aquariums cloisonnés et recouverts de plastique noir pour éviter tout stress visuel. Les conditions physico-chimiques moyennes sont les suivantes : température : 16,5°C ; conductivité : 450 µS/cm ; pH : 7,1 ; oxygène dissous : 9 mg/l. Le débit d'eau est supérieur à 1 litre/min/kg de poissons.

En cas d'induction artificielle, les poissons reçoivent une injection intrapéritonéale de bétanaphtoflavone (bNF) dans de l'huile d'arachide (45°C) à raison de 1 ml/kg pour les barbeaux et chevaines et 10 µl/g pour les goujons. La concentration en bNF de la solution injectée dépend de la dose en bNF qui est choisie pour l'expérience (de 0,5 mg/kg à 100 mg/kg).

Les poissons ne sont pas nourris le jour d'injection ni le jour de dissection. Les autres jours, ils reçoivent une ration journalière à raison de 1% de leur poids. D'autre part, nous avons choisi de ne pas anesthésier les poissons avant l'injection alors que certains auteurs, pour éviter le stress des poissons et faciliter leur manipulation lors de l'injection, utilisent des anesthésiants : chlorobutanol (Skaare *et al.*, 1991), phénoxyéthanol (Snégaroff et Bach, 1989), tricaïne (Levine *et al.*, 1994). Kleinow *et al.* (1986) citent des études qui démontrent une inhibition légère d'activité ou au contraire une induction par la tricaïne, mais ils n'ont quant à eux pas noté d'effet à 50 mg de tricaïne/litre pour une injection de 100 mg de bNF par kg de truite.

2.2 Les poissons

2.2.1 Choix des espèces

Parmi les espèces courantes de poissons de nos rivières, nous avons sélectionné trois espèces de cyprinidés en tenant compte des critères rassemblés dans le Tableau 2-1. Il s'agit de retenir des espèces courantes sur le terrain (dans des sites pollués ou propres) mais qui puissent être maintenues dans de bonnes conditions au laboratoire compte tenu des objectifs de notre étude. La possibilité d'approvisionnement en pisciculture était un critère important, ainsi que la facilité de stockage d'individus adultes afin de permettre l'étude de l'influence de la maturation sexuelle sur l'induction de l'EROD.

Tableau 2-1. Critères de sélection des espèces.

espèce	échantillonnage[a]	pisciculture[b]	taille[c]	stabulation[d]	polluo sensibilité[e]	Connaissances P450
Barbeau	+	-	-	+	+	+
Blageon	-	-	+	-	-	-
Carpe	-	+	--	+	+	+
Chevaine	++	-	-	+	+	+
Gardon	+	+	-	-	+	+
Goujon	+	+	+	+	+	+
Hotu	+	-	-	-	+	+
Loche	+	-	+	-	+	-
Perche	-	+	-	+	+	+
Rotengle	-	+	-	-	+	-
Vairon	-	+	+	+	-	-

[a]Ubiquité dans le bassin du Rhône et efficacité de pêche.
[b]Possibilité d'approvisionnement en pisciculture.
[c]Taille des adultes compatible avec la stabulation en laboratoire.
[d]Fragilité en laboratoire.
[e]Selon Verneaux (1981).

Le choix final est ainsi un compromis entre terrain et laboratoire puisque seront retenues les espèces ubiquistes (dans des sites pollués ou non) dont la stabulation en laboratoire est possible (fragilité, taille compatible) ainsi qu'un approvisionnement en pisciculture. Nous avons également tenu compte des connaissances éventuelles sur l'induction du cytochrome P450 chez ces espèces.

Dans ces conditions, blageon, hotu, perche et rotengle n'ont pas été retenus du fait de leur relative rareté sur le terrain. De même, le vairon est polluo-sensible et absent dans le Rhône. La loche est trop petite, tandis que la carpe adulte est trop grande et, comme le gardon, elle fait l'objet de réintroductions qui rendent délicates les interprétations (histoire).

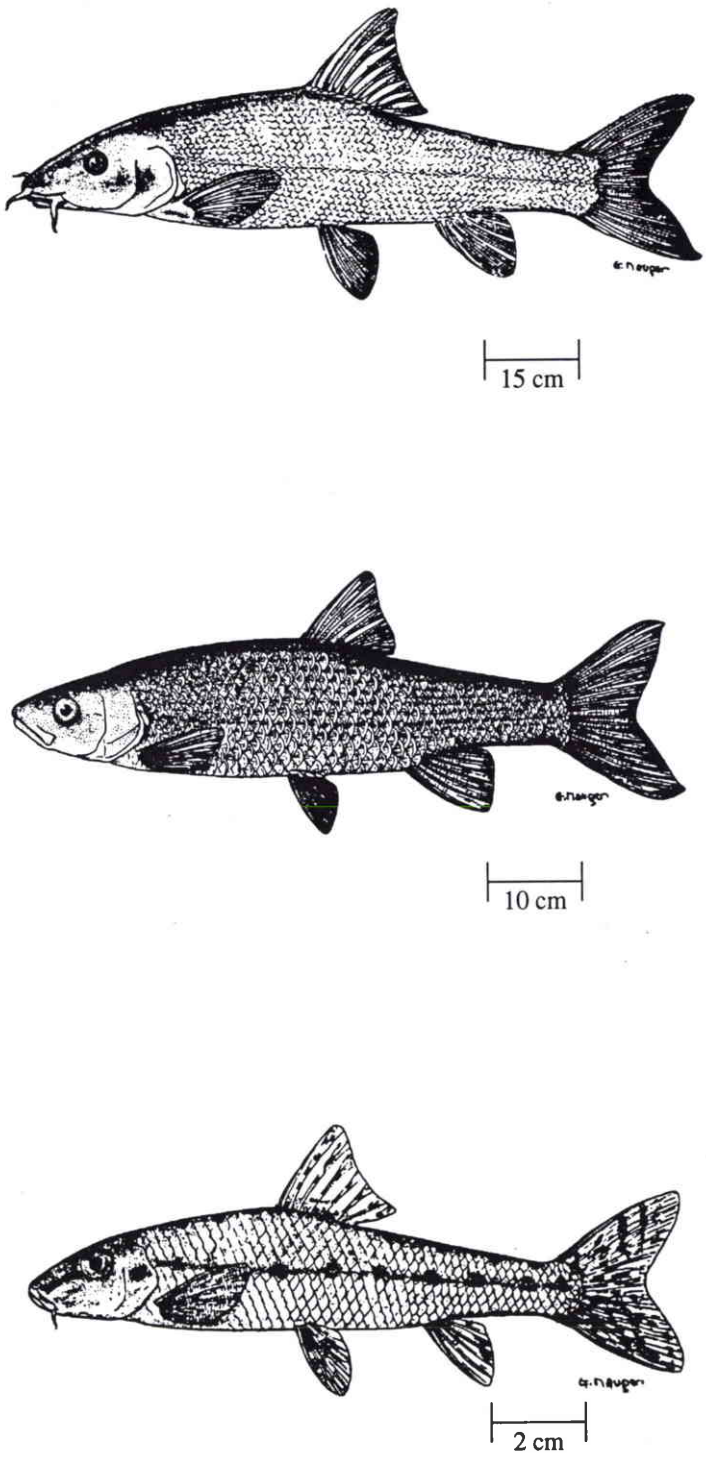


Figure 2-2. Barbus barbus, Leuciscus cephalus et Gobio gobio d'après Spillmann (1961).

Les trois espèces retenues finalement sont le barbeau (fluviatile), le chevaine et le goujon (Figure 2-2). Ces espèces appartiennent à la classe des téléostéens, à l'ordre des cypriniformes et à la famille des Cyprinidae qui est la famille numériquement la plus importante en France (Spillmann, 1961). Cette famille est principalement caractérisée par son appareil masticateur : dents pharyngiennes et absence de dents sur les mâchoires. Les genres *Barbus* et *Gobio* sont proches et se distinguent des autres genres par les barbillons labiaux, la nageoire dorsale et les dents pharyngiennes. *Barbus* est le plus allongé tandis que *Gobio* est le plus petit (Bernet, 1960).

Chez les cyprinidés, la période de reproduction dépend de la photopériode et de la température : le début est déclenché par une température de l'eau moyenne minimale de 14-15°C environ (mai) tandis que la fin (juin-juillet) est marquée par la décroissance de la photopériode (Kestemont, 1987 ; Poncin, 1988). En conséquence, on peut observer un étalement des périodes de ponte selon la rivière étudiée, entre mai et août.

Les détails concernant les trois espèces sont rassemblés dans le Tableau 2-2. La plupart des informations biologiques sur le barbeau sont tirées de Poncin (1988), sur le chevaine de Mann (1976), et le goujon de Bernet (1960) et Kestemont (1987). Les autres sources sont éventuellement citées.

Tableau 2-2. Description biologique des trois espèces de cyprinidés retenues.

		Barbeau fluviatile	Chevaine	Goujon
		Barbus barbus	*Leuciscus cephalus*	*Gobio gobio*
Morphologie	Taille et poids maximaux	120 cm-10 kg	60 cm-3 kg	12 cm-20 g*
Alimentation		benthique omnivore larves, mollusques, diptères (Kraiem, 1980)	omnivore puis carnassier larves, mollusques, poissons	benthique, carnivore insectes, mollusques
Reproduction	Age	~8 ans (femelles) ~2-3 ans (mâles)	~5 ans (femelles) ~3 ans (mâles)	~2 ans (femelles) ~3 ans (mâles)
	Saison	mai-juin (température 14-18°C)	mai-juin (température 14-18°C)	mai-juin (température 15°C)
	Rapport Gonado Somatique	1-2% à 13% (femelles) 1% à 9% (mâles)	3% à 12% (femelles) 1% à 5% (mâles)	3% à 14% (femelles) 1% à 3% (mâles)
	Support de ponte	lithophile	lithophile	phyto-lithophile
Habitat	Rhéophilie Position	rhéophile benthique	rhéophile pélagique	indifférent benthique
Ambiance[b]	Hauteur d'eau (cm) Vitesse du courant (cm/s) Substrat	>30 60 pierres, blocs	100 20-60 indifférent	20-40 30 sable, gravier, pierres
Optimum physico-chimique[a]	Oxygène (mg/l) NH_4 (mg/l) PO_4 (µg/l) pH	9,3-12,2 <1,6 <350 7,4-8,1	8,4-10 <1,9 <750 6,6-8,2	8,4-12,4 <17,7 <750 6,5-8,1

[a] Selon Philippart (1989) sur 164 cours d'eau et 471 stations.
[b] D'après Pouilly (1994).
*Hypothèse de repeuplements avec goujons de taille supérieure (jusqu'à 20 cm).

2.2.2 Le barbeau

Le barbeau fluviatile (*Barbus barbus*, Linné 1758), le plus grand cyprinidé d'Europe, est caractéristique des rivières de la zone à barbeau (Huet, 1949) : rivières à courant assez rapide (espèce rhéophile), à fond caillouteux graveleux où l'eau est fraîche et bien oxygénée.

L'aire de distribution du barbeau s'étend sur la majeure partie de l'Europe occidentale (extension méridionale limitée aux bassins du Rhône et du Danube). Il n'a jamais été détecté en Scandinavie (Philippart, 1987). Relativement sédentaire en dehors de la période de frai, le barbeau peut être amené à se déplacer considérablement (10 km) en période de reproduction (Baras, 1992).

2.2.3 Le chevaine

Le chevaine (*Leuciscus cephalus*, Linné 1758) est présent très largement dans toutes les rivières françaises. On le rencontre dans les eaux claires, courantes ou stagnantes mais il s'accommode d'un large éventail de conditions écologiques. Très ubiquiste, il est présent dans toute l'Europe hormis l'Irlande (Philippart, 1972).

2.2.4 Le goujon

Le goujon (*Gobio gobio*, Linné 1758) est un poisson très répandu. En Europe, son aire de répartition est limitée au Nord à 60° de latitude (Ecosse, Scandinavie) et à 40° de latitude au sud (Pyrénées, Grèce) ce qui correspond à des températures estivales comprises entre 15 et 27°C (Bernet, 1960). Sa croissance est rapide jusqu'à 3-4 ans où il atteint 10 à 20 cm. En période de reproduction, les mâles portent des "boutons nuptiaux" qui apparaissent début avril sur le sommet de la tête et les opercules. Si le goujon s'accommode d'habitats diversifiés, il semble surtout rechercher des eaux claires assez rapides, à fond pierreux, graveleux ou sablonneux où il demeure très sédentaire.

2.2.5 Variables biologiques mesurées

Des mesures biologiques complémentaires à la mesure de l'activité EROD ont été effectuées sur les poissons disséqués : variables morphologiques, poids d'organes (foie, gonades).

2.2.5.1 Taille, poids, Facteur de condition, Rapport Hépato-Somatique

Le facteur de condition (FC=poids/longueur^3) et le rapport hépato-somatique (RHS=poids du foie/poids total x 100) sont des outils simples à mesurer et capables de rendre compte des changements saisonniers dans les réserves énergétiques (Lambert et Dutil, 1997). Si le FC traduit la mobilisation des protéines, le RHS donne des indications sur une éventuelle altération des cellules hépatiques (Sloof *et al.*, 1983) ou sur le statut nutritionnel général

(Levine *et al.*, 1995). Plus généralement, ce sont des indicateurs de santé, de nutrition et de croissance qui prennent en compte l'histoire du poisson.

L'idée d'utiliser le facteur de condition vient de l'usage des relations poids-taille chez les poissons : poids=a taille^b. En moyenne b est proche de 3 mais si b est très différent de 3 alors FC sera certainement corrélé à la taille (Le Cren, 1951). En ce qui concerne notre échantillonnage, b est compris entre 2,9 et 3,2 selon l'espèce et quel que soient le sexe ou la saison (Tableau 2-3) ce qui justifie l'emploi du facteur de condition et permet des comparaisons inter-sites et inter-saisons pour une même espèce.

Tableau 2-3. Relations poids-taille pour les trois espèces de cyprinidés (données 1995).

Espèce	Relation poids (g) - taille (mm)	R^2
Barbeau	Log(poids)= -11 + 2,9 Log(taille)	0,99
Chevaine	Log(poids)= -12 + 3,1 Log(taille)	0,99
Goujon	Log(poids)= -13 + 3,2 Log(taille)	0,91

2.2.5.2 Sexe, gonades, Rapport Gonado-Somatique

Il n'existe pas de dimorphisme sexuel sur la base de la morphologie pour ces trois espèces hormis parfois des boutons nuptiaux chez les mâles. Pour la détermination du sexe, la dissection est donc incontournable. Le Rapport Gonado-Somatique (RGS=poids des gonades/poids total x 100) nous permet alors d'estimer l'état de maturité globale des poissons même si en toute rigueur cet indice n'est pas très précis lorsqu'on se situe à la limite de la période de reproduction ; il serait nécessaire alors de procéder à une analyse histologique afin de déterminer l'évolution ovocytaire (Kestemont, 1987).

Dans la mesure où ce sont les hormones sexuelles qui interagissent avec le mécanisme de l'induction, le RGS est intéressant puisqu'il est convenablement corrélé avec les concentrations hormonales :

Chez le barbeau mâle (Poncin, 1988), on observe une corrélation significative entre RGS et testostérone : testostérone (ng/ml) = 0,59 RGS + 0,29 ($R=0,87$; $p<0,01$).

Chez le turbot femelle (Arukwe et Goksøyr, 1997), log(RGS) et log(17β-oestradiol) sont corrélés significativement ($R=0,6$; $p<0,001$).

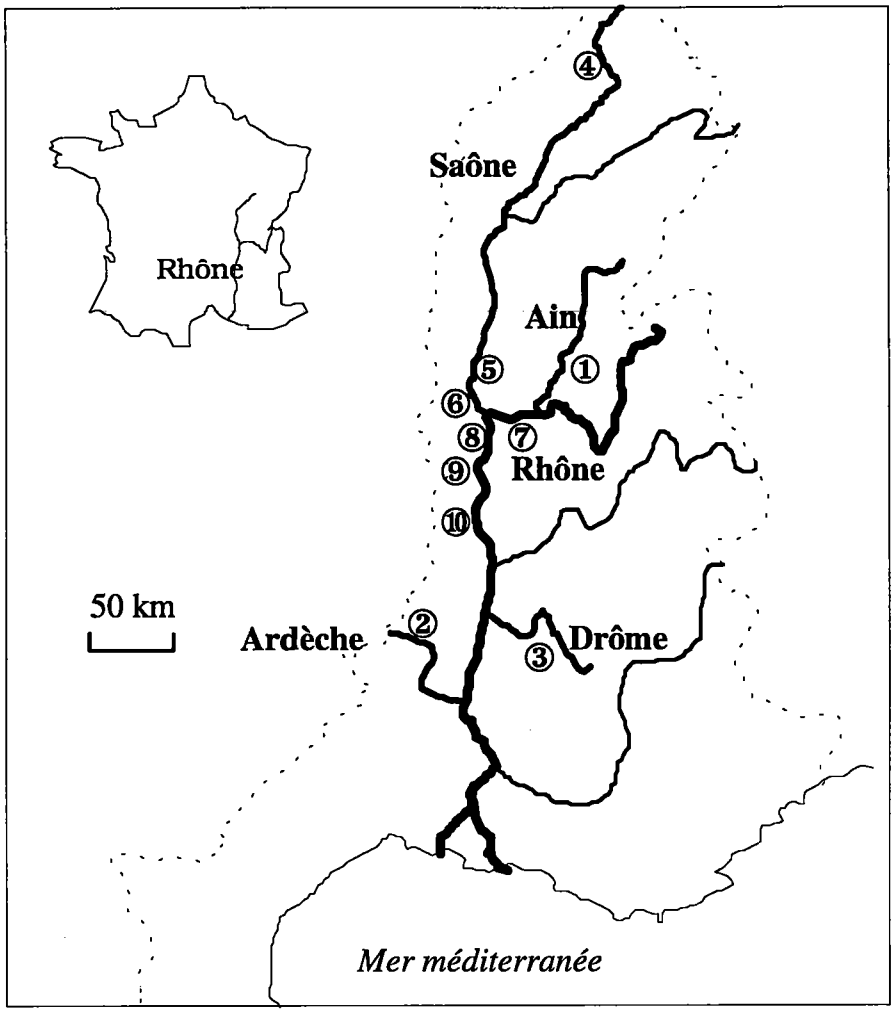


Figure 2-3. Carte des sites de prélèvement dans le bassin du Rhône.

Tableau 2-4. Description sommaire des sites d'étude et synthèse de qualité selon les classes de qualité de l'Agence de l'eau RMC (dernière campagne entre 1994-1996).

Identification	RNB[a]	Pente (m/km)	Largeur (m)	Débit moyen (m^3/s)	Température (°C)	Conductivité (µs/cm)	Classe de qualité[c]	Azote-Phosphore[c]	Métaux[c] Sédiments	Métaux[c] Bryophytes
Ain	92000	1,2	90	123	13	325	1A	N0-P0	M1[b]	M1
Ardèche	114450	3,8	50	17	14	50	1A	N0-P0	M1[b]	M1
Drôme	108000	3,3	20	19	11	320	1A	N1-P1	M1[b]	M0
Cendrecourt	1000	0,5	20	18	13	375	1B-2	N1-P2	M2[b]	M1
Trévoux	53800	0,1	200	435	14	437	1B	N1-P1	M3	M3
Collonges	59500	0,1	200	435	14	443	2	N1-P1	M2	M2
Jons	92500	0,5	200	598	13	309	1B	N1-P0	M1	-
Vernaison	93900	0,5	100	10-20[d]	13	351	1B-2	N1-P1[b]	M1	-
Chasse	98000	0,5	200	1000	13	362	2	N1-P1	M1	M2
Serrières	100900	0,5	200	10-20[d]	14	380	2	N1-P1[b]	M1	-

[a]Point RNB le plus proche.
[b]Calcul à partir des données Cemagref.
[c]1A (ou M0)=Bonne ; 1B (ou M1)=Assez Bonne ; 2 (ou M2)=Médiocre ; 3 (ou M3)=Mauvaise ; 4=Hors classe.
[d]Vernaison et Serrières sont des secteurs court-circuités du Rhône avec débits réservés de 10-20m^3/s.

2.3 Secteurs d'étude

2.3.1 Localisation et échantillonnage

Le chevaine a pu être prélevé sur tous les sites retenus et à chaque campagne. Il n'en est pas de même pour le goujon ni pour le barbeau qui sont moins abondants (Tableau 2-5). L'effort principal d'échantillonnage a été consacré à 6 stations : Ain (station Blyes), Ardèche (station Vals), Drôme (station Saillans), Cendrecourt (Saône amont), Rhône 1 et Rhône 2 (Tableau 2-5). Ces stations ont été étudiées 2 fois en 1995 (printemps et automne). Seules les stations de Ain, Rhône 1 et Rhône 2 ont été étudiées en 1996 pour valider les résultats de 1995[26]. Parallèlement à ces campagnes, les données obtenues sur des sites du Rhône et de la Saône à l'occasion des études du Réseau Hydrobiologique et Piscicole (RHP) (printemps 1995 et printemps 1996) ont été utilisées pour valider les résultats et apporter d'autres types d'informations tant chimiques (métaux bioaccumulés) que biologiques (bilan sanitaire)[27].

Tableau 2-5. Localisation des sites et échantillonnage des poissons.

Cours d'eau	Identification		1995		1996	
			printemps	automne	printemps	automne
Ain	Ain	①	bcg	bcg	bcg	bcg
Ardèche	Ardèche	②	bcg	cg		
Drôme	Drôme	③	bc	bc		
Saône	Cendrecourt	④	cg	bcg	cg	
	Trévoux	⑤	c		c	
	Collonges	⑥	c		c	
Rhône	Jons	⑦	c		c	
	Vernaison (Rhône 1)	⑧	cg	bcg	cg	cg
	Chasse	⑨	c		c	
	Serrières (Rhône 2)	⑩	cg	cg	cg	bcg

b : barbeau ; c : chevaine ; g : goujon. En grisé : campagne prévue.

2.3.2 Description des sites

Le Tableau 2-4 décrit sommairement ces dix stations avec des descripteurs classiques. On constate globalement que les sites de l'Ain, de l'Ardèche et de la Drôme sont de bonne qualité globale tandis que les sites de la Saône et du Rhône présentent des contaminations métalliques globalement supérieures à celles des autres sites (Tableau 2-4).

---

[26] Avec en 1996 la mesure complémentaire d'un impact génotoxique (essai Comètes) avec A. Devaux de l'INRA.

[27] Les pêches ont été réalisées par le Conseil Supérieur de la Pêche, les analyses chimiques par le LDA26 et le bilan sanitaire par le Dr Morand du LDA39.

Les aménagements du cours de l'Ain sont nombreux (ils permettent de régulariser le débit et de produire de l'électricité), hormis à l'aval, avant la confluence avec le Rhône, où la rivière a été classée en réserve naturelle. Les populations piscicoles de cette partie de l'Ain sont dominées par le blageon, la loche franche et le vairon (Pouilly, 1994).

Tout comme l'Ain, l'Ardèche a un régime hydrologique caractérisé par des crues au printemps et à l'automne. L'étiage est quant à lui particulièrement sévère bien qu'artificiellement soutenu. On y trouve en majorité du barbeau, chevaine, goujon et spirlin (Pouilly, 1994).

La Drôme est une rivière d'excellente qualité chimique et biologique qui se caractérise par un régime torrentiel et un fort transport solide (galets). Le peuplement piscicole est dominé par le barbeau, le blageon, le chevaine, et le vairon (Thevenet, 1995).

La qualité physico-chimique des eaux de la Saône est préoccupante (nitrates, eutrophisation) dès l'amont, avec à l'aval des polluants agricoles et industriels. C'est dès la source une rivière de plaine avec les espèces associées : carpe, chevaine, brême.

Enfin, le Rhône est un fleuve à fort débit et régime variable. Des aménagements hydroélectriques nombreux ont été effectués le long du fleuve. Ces paliers successifs sont composés d'une retenue, d'un bras court-circuité (avec débit réservé)[28] et d'un canal d'amené à l'usine hydroélectrique. A l'aval, dominent l'ablette, le chevaine et le gardon (Pouilly, 1994).

2.4 Analyse chimique des chairs et des sédiments

Les muscles de poisson ont été prélevés en vue de quantifier la contamination en PCB et autres pesticides chlorés, tandis que dans les sédiments a été recherchée la présence de métaux et de HAP (Elskus et Stegeman, 1989). Ces familles chimiques représentent en effet des candidats potentiels à l'induction ou à l'inhibition de l'activité EROD.

Les dosages dans les muscles de poissons et dans les sédiments ont été réalisés par le laboratoire LDA 26 selon une technique multi-résidus quantitative décrite ci-dessous.

2.4.1 Campagnes de sédiments

Des sédiments superficiels ont été prélevés à l'aide d'une drague manuelle à fond plat (Rofès *et al.*, 1981) en regroupant trois points de prélèvement par site. Ces échantillons de sédiment ont été soumis à l'analyse chimique pour les stations 1 à 4 en décembre 1995, pour les stations 8 et 10 en mai 1996, et les autres stations dans le cadre du RNB (programme ECOTOX Rhône) en mars 1996.

[28] C'est le cas pour les stations de Vernaison et de Serrières.

2.4.2 Campagnes de collecte de chair de poisson

Lors de chaque pêche, un échantillon de muscle de 10-50 g est conservé par poisson et congelé avant dosage. Les PCB et organochlorés sont des composés très persistants dont le caractère hydrophobe explique leur distribution dans les graisses et particules plutôt que dans l'eau. Les résultats ont donc été rapportés à la quantité de matière grasse des poissons, mesurée après extraction à l'hexane à 140°C.

2.4.3 Choix de la stratégie de dosage

La méthode d'analyse « multi-résidus organiques » est un outil performant développé au LDA 26 et validé pour les eaux et sédiments (LDA 26, 1995) et en cours de validation pour les matrices biologiques (LDA 26, 1997). Elle permet, par la conjugaison des méthodes chromatographiques adaptées (Figure 2-4), la détection des 132 molécules de la liste I de la directive CEE 76/464 qui sont de caractéristiques (polarité, volatilité) différentes.

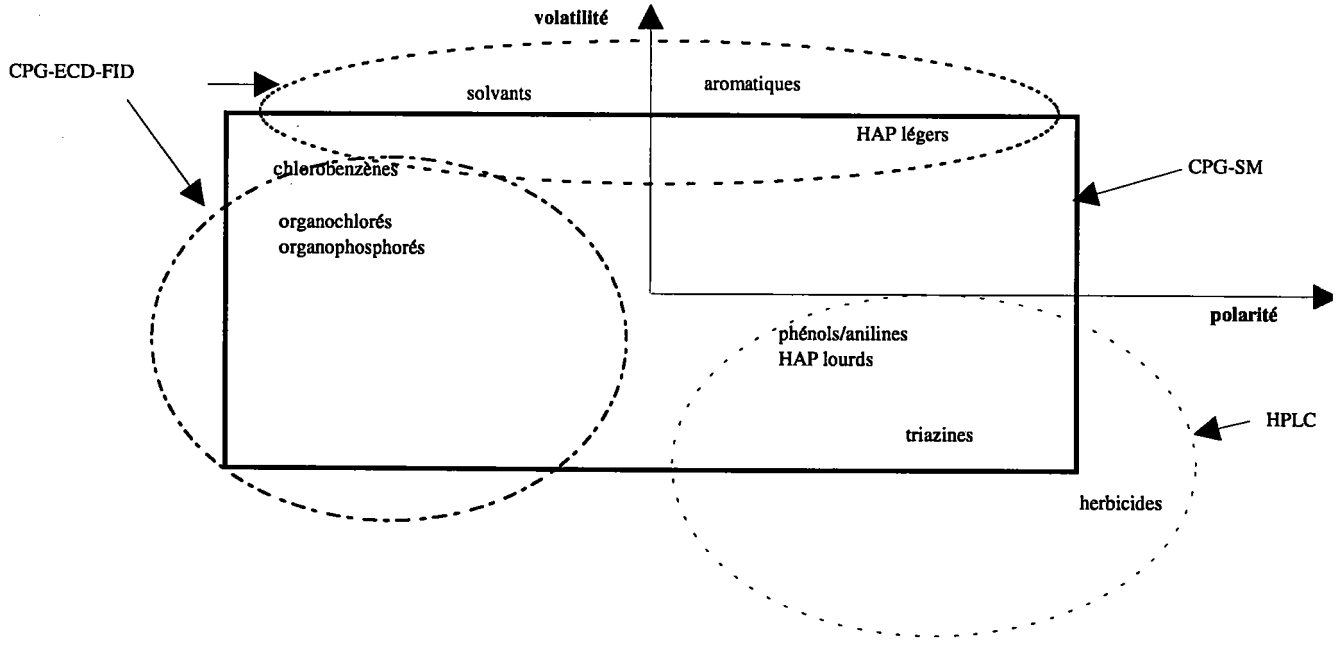


Figure 2-4. Domaine d'application des différentes techniques chromatographiques (d'après LDA 26, 1995).

Les conditions expérimentales des lectures en HPLC, CPG-ECD-FID, et CPG-SM sont détaillées dans les articles 3 et 4 pour les muscles et les sédiments et sont schématisées par la Figure 2-5. Les seuils de détection pour deux substances caractéristiques des deux familles chimiques PCB et HAP sont présentés dans le Tableau 2-6.

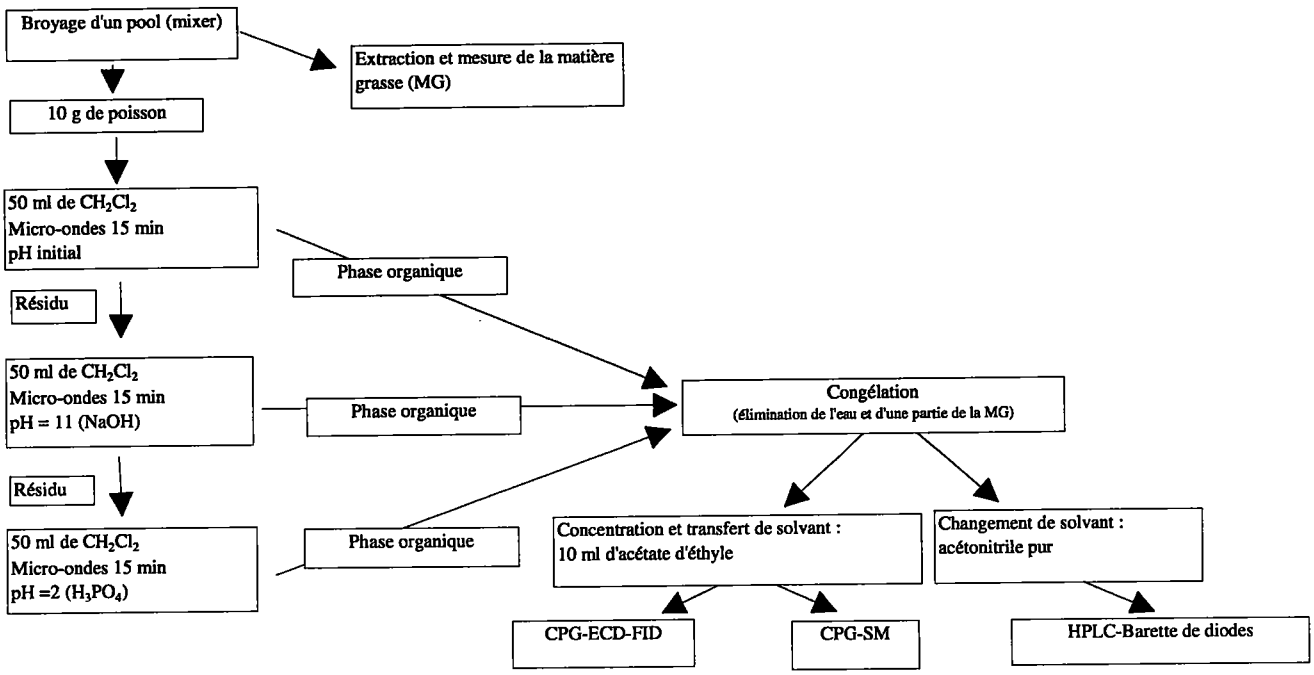


Figure 2-5. Protocole expérimental de dosage des micropolluants organiques dans les muscles de poissons (d'après LDA 26, 1997).

Tableau 2-6. Seuils de détection de la méthode multi-résidus pour deux molécules dans du sédiment et la moule (Dreissena polymorpha).

Molécule	Sédiment	Moule	
	mg/kg PS	mg/kg PS	µg/g MG[a]
PCB153	0,05	0,04	0,4
BaP	0,05	0,01	0,1

[a] Calculé avec une teneur en matière grasse (MG) de 11% par rapport au poids sec (PS) (moyenne chevaines 1995).

2.4.3.1 Foie ou muscle ?

Nous avons comparé la contamination de deux organes du poisson : le foie et le muscle. Le muscle présente l'intérêt d'être proportionnellement présent en grande quantité dans le poisson. Le foie est quant à lui l'organe de biotransformation des xénobiotiques.

Des foies et des muscles de chevaines ont donc été prélevés dans un site "non-pollué" (Ardèche) et un site pollué (Vernaison) et ont été soumis, après regroupement, à l'analyse avec la méthode multi-résidus. Dans les foies et muscles de l'Ardèche aucun composé n'a été détecté.

Tableau 2-7. Résultats de CPG-ECD sur muscles et foies de chevaines prélevés à Vernaison.

Micropolluants organiques détectés	Concentration en µg/kg poids frais		Concentration en µg/g lipides	
	Foie	Muscle	Foie	Muscle
HCB	2	1	0,01	0,01
Lindane	2,8	1,6	0,02	0,02
PCB eq. Aroclor 1254	448	256	2,49	2,84
PCB101	14	8	0,08	0,09
PCB118	7	4	0,04	0,04
PCB153	54	32	0,30	0,36
PCB138	29	24	0,17	0,26
PCB180	36	23	0,20	0,26

MG (Vernaison muscle) = 0,9% PF
MG (Vernaison foie) = 1,8% PF

Les résultats (Tableau 2-7) indiquent que les résultats des dosages sur muscle et sur foie ont été comparables (une fois rapportés à la quantité de matière grasse) ce qui confirme les conclusions d'autres études (par exemple, Asplund *et al.*, 1990). Le dosage sur chair de poisson est cependant plus facile à mettre en oeuvre car le muscle contient moins de matière grasse (susceptible d'entraîner des interférences) et c'est donc cette matrice biologique qui a été retenue pour l'ensemble des dosages.

2.5 Mesure de l'activité EROD

2.5.1 Principe de la méthode de dosage

Le dosage repose sur la détection de la fluorescence de la résorufine, produit de transformation de la 7-ethoxyrésorufine par l'activité enzymatique (Figure 2-6).

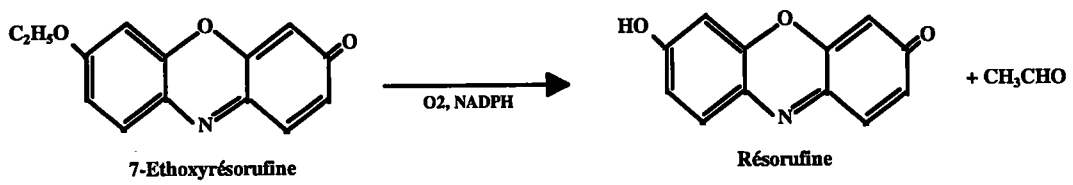


Figure 2-6. Réaction catalysée par l'EROD.

Les nécessités de l'utilisation du dosage de l'EROD en biomonitoring 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 Galgani, 1992 ; Burnison *et al.*, 1996). Nous avons choisi d'adapter la méthode existante au laboratoire (Namour, 1992 ; Richert, 1994) aux volumes des cuves de microplaque 96 puits.

Le protocole utilisé ainsi que ses caractéristiques (linéarité, sensibilité, étalonnage...) sont décrits en annexe A. Notons que la sensibilité de la mesure (1,2 pmol/min/mg de protéines) (annexe A) impose le nombre de chiffres significatifs dans les tableaux.

2.5.2 Présentation des résultats d'activités EROD

Quel que soit le groupe de poissons étudié[29], on peut observer que la variabilité (écart-type) des activités EROD augmente proportionnellement à la moyenne des activités EROD des poissons du groupe (Figure 2-7) (article 4). Autrement dit, plus les poissons sont globalement induits et plus il y a de grandes variations d'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.

[29] Un groupe de poissons est défini par ses coordonnées qualitatives principales : (station, date, espèce, sexe).

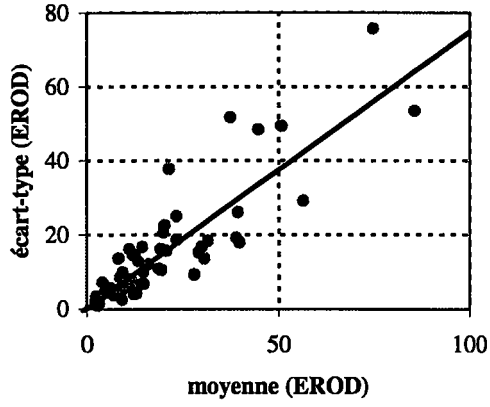


Figure 2-7. Augmentation de la variabilité avec l'induction de l'EROD in situ (données chevaines 1995).

Cependant, on montre qu'avec une telle relation moyenne-variance, une transformation logarithmique permet de stabiliser la variance et d'obtenir la normalité (Tomassone *et al.*, 1993). Nous avons effectivement vérifié avec nos données et celles obtenues précédemment par le laboratoire, qu'après transformation logarithmique des données EROD, les variances sont homogènes (test de Levene) et les distributions normales (Chi^2)(article 4).

La position moyenne d'un groupe peut alors être décrite par la moyenne des logarithmes d'EROD ou par la moyenne géométrique des activités EROD. Par exemple, la Figure 2-8 illustre pour l'activité EROD des chevaines la position « intermédiaire » du site de Rhône 1, entre les sites de l'Ain et de Rhône 2, séparés par un facteur 10 d'induction.

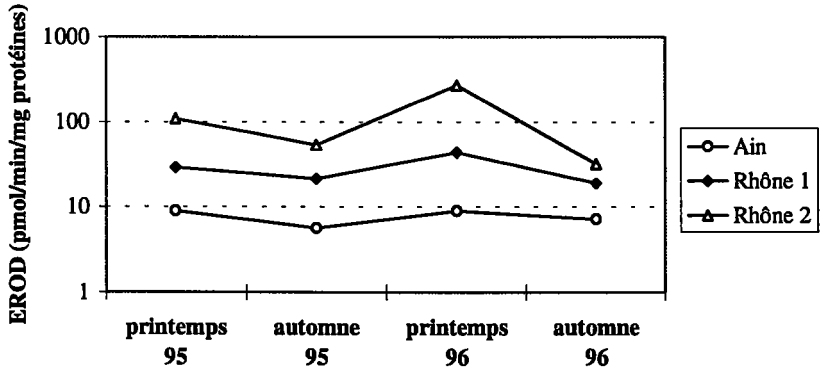


Figure 2-8. Valeurs EROD moyennes (pmol/min/mg protéines) de chevaines mâles de trois sites pour quatre campagnes.

Les mesures d'activité EROD de ce travail seront donc exprimées soit en données logarithmiques soit en données originelles en prenant l'antilog des moyennes et des intervalles de confiance. Cette méthode a également été proposée par d'autres auteurs (Burnison *et al.*, 1996).

2.5.3 Inductibilité des espèces retenues

Avant de commencer les mesures de l'induction du cytochrome P450 1A sur les sites retenus, nous avons vérifié, sur les trois espèces de cyprinidés, l'inductibilité de l'activité EROD par la béta Naphtoflavone (bNF). Ces premiers résultats (Tableau 2-8) ont été obtenus sur des poissons de l'Ardèche après une injection i.p de 50 mg/kg de bNF et une dissection 72h après l'injection.

Tableau 2-8. Comparaison de l'inductibilité de l'activité EROD (pmol/min/mg de protéines) avec 50mg/kg de bNF sur des cyprinidés de l'Ardèche (5 individus par lot sans distinction de sexe).

	Activité EROD basale	Activité EROD induite	Taux d'induction
barbeaux	3	16	5
chevaines	20	90	5
goujons	15	174	12

On constate que les trois espèces de poisson sont inductibles. Si l'on compare ces résultats avec des taux d'induction répertoriés dans la littérature pour des doses en bNF similaires et des durées identiques (Tableau 2-9 et Tableau 2-10), on en déduit que ces cyprinidés sont moins inductibles que les salmonidés (qui présentent des inductions d'un facteur 100). Cependant d'autres espèces présentent des taux d'induction similaires.

Tableau 2-9. Induction de l'activité EROD par la bNF chez la truite (Oncorhynchus mykiss).

dose injectée (mg/kg)	durée d'exposition	taux d'induction	référence
50	3 jours	27,6	Celander et Förlin, 1992
50	2 jours	211,9	Förlin et Celander, 1993
50	3-4 jours	70,7	Goksøyr *et al.*, 1991
100	66 heures	18,5	Kleinow *et al.*, 1990
100	3 jours	189	Andersson *et al.**, 1985
100	3 jours	45	Elcombe *et al.**, 1979

* : cités par Sijm et Opperhuizen, 1989.

Tableau 2-10. Induction de l'activité EROD par la bNF chez diverses espèces de poissons.

espèce	dose injectée (mg/kg)	durée d'exposition	taux d'induction	référence
Proposium williamsoni	20	4 jours	43,5	Kloepper-Sams et Benton, 1994
Limanda limanda	20	6 jours	19,9	Addison *et al.*, 1991
Platichthys flesus	40	6 jours	282,9	
Pseudopleuronectes americanus	20	6 jours	4,9	
Fundulus heteroclitus	50	4 jours	7,3	Kloepper-Sams et Stegeman, 1988
Gadus morhua	50	8 jours	1,05	Husoy *et al.*, 1993
Perca fluviatilis	50	2 jours	5,8	Förlin et Celander, 1993
Esox lucius	50	2 jours	9,7	
Limanda limanda	50	2 jours	13,3	
Zoarces viviparus	50	2 jours	17	
Ictalurus punctatus	50	2 jours	2,8	Tate *1988
	50	5 jours	2,3	
Perca fluviatilis	50	3-4 jours	26,1	Goksøyr *et al.*, 1991
Gadus morhua	100	3-4 jours	71,1	
Cyprinus carpio	100	10 jours	5,5	Melancon *et al.*, 1981

* : cités par Sijm et Antoon Opperhuizen, 1989.

2.6 Dosage par voie immunochimique

Aucune détection immunochimique du cytochrome P450 1A n'avait jamais été réalisée sur les cyprinidés étudiés dans ce travail. Les prélèvements de foie réalisés dans le cadre du préliminaire présenté au chapitre 2.5 ci-dessus ont ainsi permis de tester un protocole immunochimique de détection (Figure 2-9)[30].

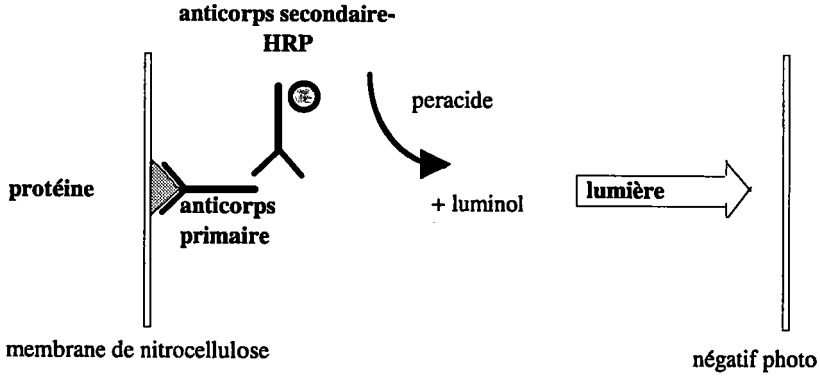


Figure 2-9. Détection immunochimique et procédé ECL.

[30] Méthode apprise auprès de Xavier Stien du Laboratoire de Toxicologie marine de la Faculté de Médecine de Nice.

Après ultracentrifugation à 105 000g pendant une heure[31], les microsomes hépatiques sont séparés dans un gel de polyacrylamide 10% selon Laemmli (1970) puis les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose en vue de la détection immunochimique. L'anticorps secondaire est couplé à une activité peroxydase qui produit une réaction de chimioluminescence selon le procédé ECL (Enhanced Chemi Luminescence) de la firme Amersham. L'intensité du signal lumineux, signe du croisement avec des protéines P450, est visualisée sur un négatif en chambre noire après quelques minutes d'exposition. Selon Kloepper-Sams et Benton (1995), cette méthode est 10 fois plus sensible que les méthodes classiques de révélation colorimétrique.

Les essais de croisement sur western blots ont été réalisés avec deux anticorps primaires différents : un anticorps anti P450 1A de rat (Amersham) et un anticorps anti P450 1A de morue (Biosense Laboratories).

Avec l'anticorps anti P450 1A de rat, le croisement est effectif, mais la migration n'est pas cohérente en poids moléculaire tandis qu'avec l'anticorps anti P450 1A de morue, le croisement est spécifique et cohérent en poids moléculaire avec les cytochromes connus (Figure 2-10). La méthode ECL étant optimisée pour la détection avec un anticorps anti P450 1A de rat, le bruit de fond est plus important dans le cas de l'anticorps anti P450 1A de morue. Avec davantage d'anticorps disponibles, il aurait été certainement possible d'optimiser les dilutions des anticorps ainsi que des bloquants et détergents.

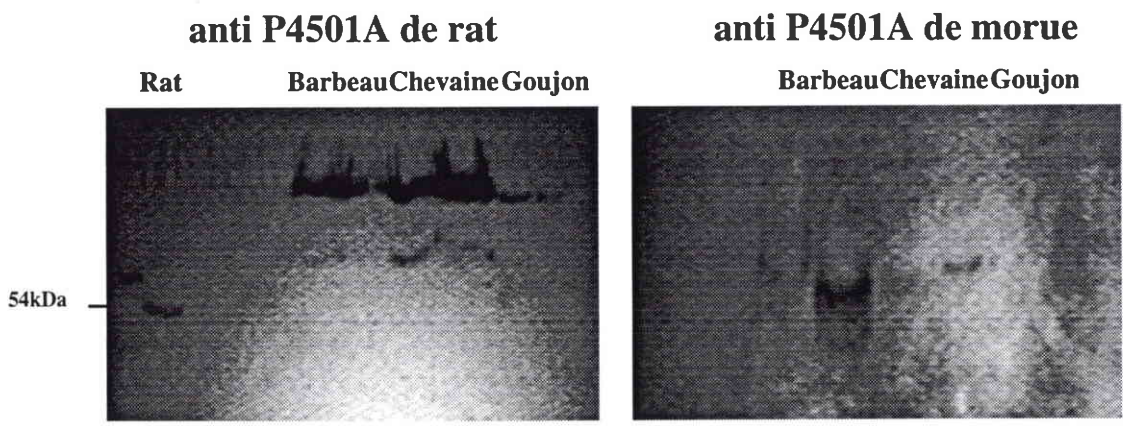


Figure 2-10. Comparaison sur les mêmes microsomes hépatiques de trois espèces de cyprinidés des détections du cytochrome P450 1A par deux anticorps différents.

[31] Nous remercions l'Institut de Biologie et de Chimie des Protéines de Lyon.

On constate par ailleurs le meilleur croisement avec les protéines de barbeau. Les protéines de goujon sont très faiblement détectées à ces concentrations et pour ce temps d'exposition (10 secondes). Par la suite, il a fallu augmenter le temps d'exposition parfois jusqu'à 15 minutes pour détecter les protéines de goujon de façon convenable. Le croisement n'a pas été observé avec l'anticorps anti P450 1A de rat contrairement à ce qui avait pu être constaté par ailleurs sur le loup de mer (Stien *et al.*, 1997) ou le poisson chat (Ronis *et al.*, 1992).

3. RÉSULTATS

Dans cette partie, nous avons synthétisé l'essentiel des résultats obtenus dans le cadre de ce travail. Les objectifs, méthodologies et discussions propres à chaque problématique sont également rappelés dans ce chapitre. Aussi souvent que nécessaire il est fait référence aux articles en annexe pour des résultats complémentaires.

3.1 Activités EROD mesurées en sites peu pollués sur des cyprinidés

3.1.1 Objectifs

Pour un biomarqueur, la fiabilité de la référence conditionne la détection et la quantification d'un impact, que cette référence soit interne (amont sur la même rivière) ou externe (site sur un autre cours d'eau). Lorsqu'il est difficile d'avoir un échantillonnage amont homogène à celui de l'aval (espèce, sexe, taille...), la connaissance des variabilités naturelles est donc nécessaire (Mayer *et al.*, 1992). La mise en place d'un système de référence général valable pour l'ensemble d'un grand système (lacs, mers, fleuves...) permettrait d'analyser des changements dans des sites contaminés mais aussi d'évaluer des évolutions à long-terme et/ou à large échelle (Balk *et al.*, 1996). Par ailleurs, ces valeurs contrôle peuvent constituer des objectifs de restauration de sites contaminés au même niveau que les sites qui ont permis l'établissement des valeurs de référence.

La sélection de sites peu pollués dans le bassin du Rhône, avec la présence probable ou connue des cyprinidés retenus, a donc été réalisée en vue de comparer les activités EROD mesurées dans ces sites.

3.1.2 Méthodologie

Le choix des sites dans le bassin du Rhône a été effectué selon des critères simples et pragmatiques :

- Rivière de moyenne importance.
- Présence des cyprinidés retenus.
- Données chimiques et piscicoles existantes.
- Absence d'effluents industriels majeurs à l'amont.

Ainsi des stations de l'Ain, de l'Ardèche et de la Drôme ont été retenues. Dans le cadre du RHP, la station de Cendrecourt à l'amont de la Saône était également échantillonnée.

Nous avons alors profité de cette station, qui présente une pollution modérée, comme élément de comparaison.

Parallèlement à des vérifications chimiques (HAP, PCB, métaux...), des indices simples d'état physiologiques (FC, RHS, RGS) ont été évalués afin de permettre une comparaison biologique entre les sites avant de mettre en oeuvre une comparaison biochimique. Ce type de démarche est conseillé par d'autres auteurs (Munkittrick et Dixon, 1989 ; Balk *et al.*, 1996).

On peut discuter la fréquence de l'échantillonnage[32] : en l'absence de connaissances, il aurait fallu étudier un seul site et sur une année avec un pas de temps d'un ou deux mois[33] avant de choisir les saisons propices. En fait, l'hiver a été écarté pour des raisons pratiques mais aussi en considérant la faible induction observée à cette saison (Richert, 1994) : à l'aval d'une usine chimique de la Durance, les inductions observées en mai-août étaient de 10-30 contre 2-5 en décembre-février. Ces remarques confirment les conclusions similaires de Narbonne *et al.* (1991).

En ce qui concerne l'influence de la maturité sexuelle sur l'activité EROD, les différences entre la saison de reproduction et les autres saisons peuvent être importantes mais un pas de temps de 2 à 3 mois est suffisant pour décrire l'effet de la maturité sexuelle (Larsen *et al.*, 1992 ; Arukwe et Goksøyr, 1997). Nous avons toutefois choisi de mesurer le rapport gonado-somatique afin de quantifier pour une même saison les éventuels écarts de maturité entre les sites.

3.1.3 Résultats

3.1.3.1 Description biologique des sites

Nous avons comparé les tailles, poids, rapports gonado-somatiques, rapports hépato-somatiques et facteurs de condition des différentes populations de poissons. Cette analyse biologique fondée sur la comparaison inter-sites d'indices permet de valider l'échantillonnage : ces valeurs étant similaires pour les sites, la comparaison du paramètre biochimique EROD est pertinente.

En effet, globalement, aucun effet sexe ni saison ne sont constatés pour les indices FC et RHS qui sont de valeurs comparables pour les trois sites (article 3). Par ailleurs, la mesure de la maturité sexuelle par l'indice gonadosomatique permet le positionnement des poissons dans la saison de reproduction. Pour ces trois espèces de cyprinidés, cet indice est compris entre 1,5 et 15 (femelles) et 8 (mâles) environ lors de la période de reproduction qui s'étend d'avril à juillet selon la température de l'eau.

---

[32] Pour chaque site, un échantillonnage au printemps (avril-juin) et un échantillonnage à l'automne (septembre-octobre).

[33] Compte tenu du temps nécessaire à la décroissance du signal EROD (voir par exemple Kloepper-Sams et Stegeman, 1989).

3.1.3.2 Détermination de valeurs EROD en sites peu pollués

Il est apparu que dans ces sites peu pollués et avec des niveaux d'activité EROD très inférieurs aux sites du Rhône à l'aval de Lyon, les facteurs espèce, sexe et saison (ainsi que leurs interactions) restaient déterminants (voir tableau 4 de l'article 3) : ils traduisent la variabilité naturelle (non chimique) de l'induction de l'EROD.

En tenant compte de ces facteurs de variabilité, les valeurs EROD mesurées pour les sites de l'Ain, l'Ardèche, et la Drôme ne sont pas significativement différentes entre elles pour chaque espèce, chaque sexe et chaque saison. Pour l'Ain, deux autres campagnes ont été réalisées en 1996 mais on ne détecte pas d'écart significatif par rapport aux valeurs précédentes (Figure 3-1). Le cas de la Saône amont (station Cendrecourt, polluée par les métaux) a représenté un exemple de perturbation significative par rapport à ces références lors de la campagne d'automne 1995 (facteur d'induction de 1,6 chez les chevaines tous sexes confondus), et n'a donc pas été intégré dans les valeurs de référence retenues.

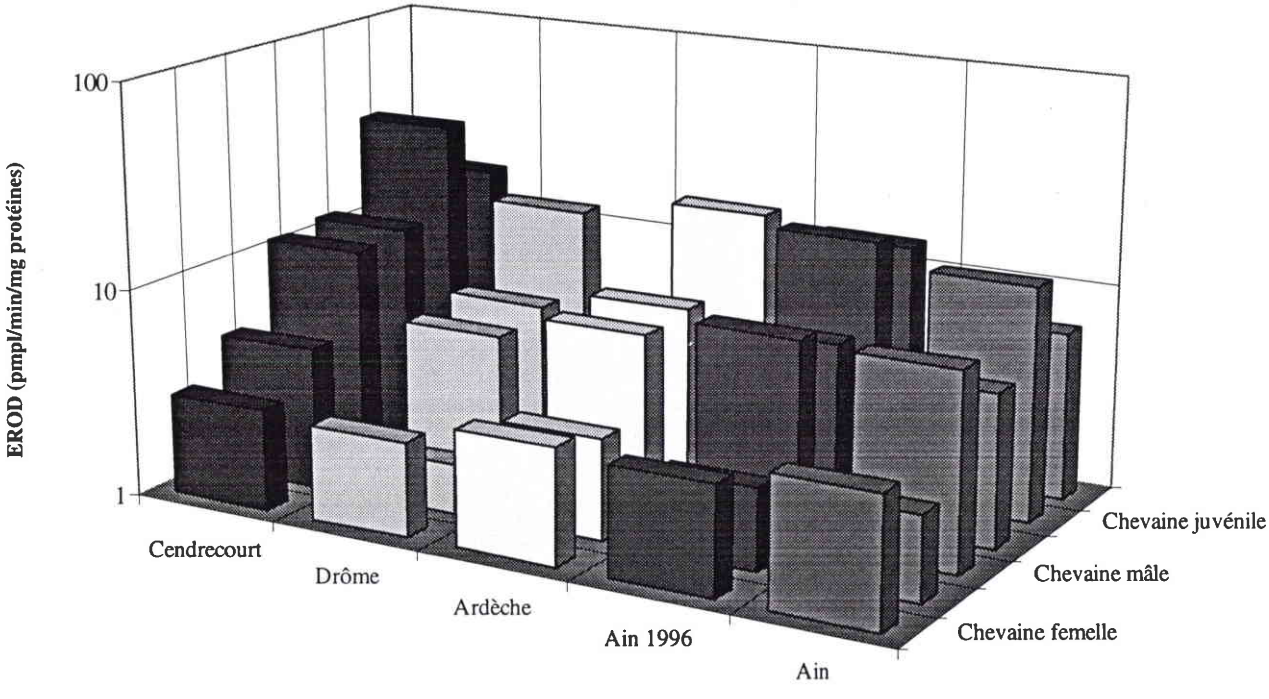


Figure 3-1. Activités EROD mesurées sur quatre sites du bassin du Rhône pour le chevaine et deux saisons. Les moyennes géométriques sont présentées.
Les résultats du printemps puis de l'automne sont représentés pour les femelles, mâles et juvéniles.
Les intervalles de confiance n'ont pas été indiqués pour améliorer la lisibilité de la figure, mais on peut se reporter à l'Annexe B.

En moyennant les résultats obtenus sur les trois sites de l'Ain, l'Ardèche et la Drôme, on peut ainsi proposer des valeurs EROD en sites peu pollués, fonction de l'espèce, du sexe et de la saison (Tableau 3-1). La différence entre mâles et femelles est plus importante en saison de reproduction (printemps). D'autre part, les niveaux EROD des goujons sont globalement

supérieurs à ceux des deux autres espèces de cyprinidés. Par ailleurs, les activités des chevaines juvéniles sont supérieures à celles des adultes (mais c'est l'inverse pour les barbeaux). On peut constater ces différences sur la Figure 3-2 où les valeurs de référence Log transformées ont été retraduites en moyennes géométriques EROD.

Tableau 3-1. Activités EROD (Log transformées) des sites de référence et comparaison avec l'Ain (96) et Cendrecourt. Moyenne ± écart-type (N).

			Référence	Cendrecourt	Ain (96)
Espèce	Sexe	Saison			
Barbeau	Femelle	Printemps	2,0 ± 1,1 (16)	-	1,8 ± 1,5 (5)
		Automne	2,5 ± 0,6 (13)	-	2,6 ± 0,7 (2)
	Mâle	Printemps	2,2 ± 1,0 (24)	-	1,7 ± 0,9 (10)
		Automne	1,5 ± 0,7 (14)	1,8 ± 0,8 (3)	1,4 ± 0,9 (5)
	Juvénile	Printemps	1,6 ± 0,9 (6)	-	1,2 ± 0,9 (10)
		Automne	1,2 ± 0,8 (10)	-	1,1 ± 0,5 (6)
Chevaine	Femelle	Printemps	1,5 ± 0,7 (30)	1,4 ± 1,0 (10)	1,5 ± 0,7 (10)
		Automne	1,2 ± 0,7 (29)	1,7 ± 0,7 (10)*	1,2 ± 0,4 (10)
	Mâle	Printemps	2,2 ± 0,8 (25)	2,5 ± 0,3 (8)	2,3 ± 0,7 (10)
		Automne	2,1 ± 0,6 (24)	2,6 ± 0,4 (9)*	2,1 ± 0,6 (9)
	Juvénile	Printemps	2,7 ± 0,9 (14)	3,6 ± 0,6 (10)*	2,9 ± 1,1 (10)
		Automne	2,2 ± 1,0 (30)	2,9 ± 0,6 (10)*	2,7 ± 0,5 (7)
Goujon	Femelle	Printemps	2,0 ± 0,9 (15)	2,1 ± 1,0 (5)	1,7 ± 1,1 (10)
		Automne	3,0 ± 0,7 (20)	3,3 ± 0,4 (10)	3,0 ± 0,5 (10)
	Mâle	Printemps	3,3 ± 0,5 (17)	3,6 ± 0,4 (5)	3,0 ± 1,0 (10)
		Automne	2,8 ± 0,6 (20)	3,4 ± 0,4 (10)*	3,0 ± 0,4 (10)

* $p<0,05$.

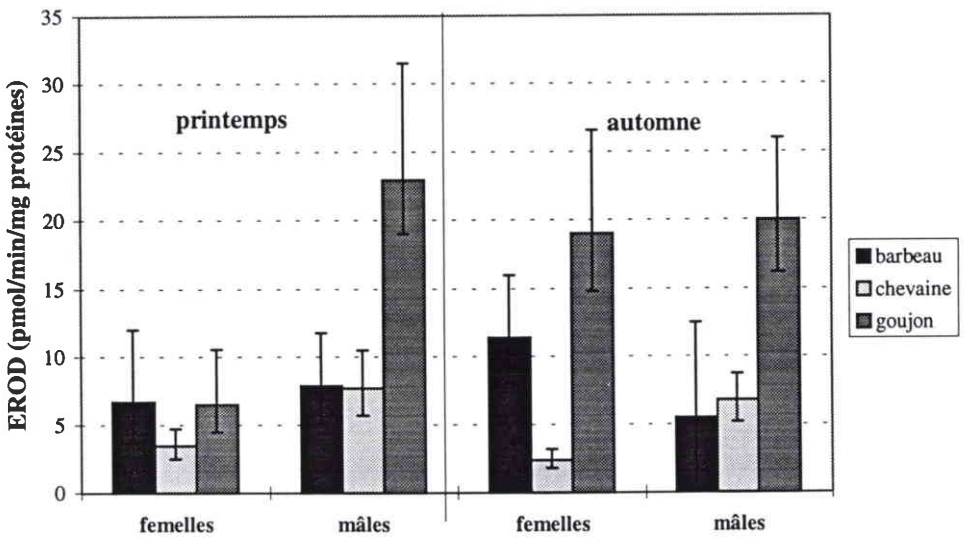


Figure 3-2. Valeurs EROD de "référence" pour trois espèces, deux sexes et deux saisons. Les moyennes géométriques et les IC 95 sont représentés.

3.1.3.3 Description chimique des sites

Les niveaux de contamination ont été vérifiés avec précaution afin de valider les valeurs biologiques obtenues. Les résultats des dosages chimiques effectués dans les sédiments sont présentés dans le tableau 5 de l'article 3 tandis que les résultats des dosages dans les muscles de poissons sont rappelés ci-dessous (Tableau 3-2).

Tableau 3-2. Composés bioaccumulés dans les muscles de barbeau et de chevaine pour les trois sites de l'Ain, l'Ardèche et la Drôme.
Seuls les minima et maxima des valeurs observées ont été portés dans le tableau.

µg/g MG.	barbeau	chevaine
PCB 101	ND-0,8	ND-0,3
PCB 118	ND-0,3	ND-0,2
PCB 138	0,04-0,9	ND-0,3
PCB 153	0,1-5	ND-0,6
PCB 180	0,04-1,1	ND-0,4
Lindane	ND-0,8	ND-0,4
pp' DDE	ND-0,6	ND-0,5
autres	ND-ND	ND-ND
MG[a]	1,9-5,8	0,9-5,4

ND: Non Détecté;
[a]% sur poids frais.

Ces résultats de contamination chimique traduisent une pollution faible, quoique détectable. Ils sont discutés plus en détail dans l'article 3. Dans la mesure où ces valeurs sont observées sans induction de l'EROD et sans effet détectable sur les autres variables biologiques considérées, elles pourraient être utiles comme valeurs de comparaison avec d'autres sites.

3.1.4 Discussion et conclusion

Aucune différence significative du point de vue physiologique ou biochimique n'a été détectée de manière systématique entre les poissons des sites de l'Ain, de l'Ardèche et de la Drôme. Ces sites sont donc comparables du point de vue biologique.

D'autre part, dans la mesure où la contamination chimique de ces sites s'est révélée être peu élevée, il apparaît que les valeurs EROD obtenues sur ces sites sont des valeurs « témoins » convenables. D'ailleurs, si l'on se réfère aux travaux de la thèse de Richert (pêches de 1991 et 1992) en reprenant les valeurs brutes EROD pour les poissons pêchés aux stations de l'amont des zones polluées étudiées et pour les mêmes saisons (printemps et automne), on constate à première vue la cohérence de ces résultats avec les nôtres (Tableau 3-3) à ceci près que la méthode de dosage est différente mais présente une bonne corrélation et un facteur de proportionnalité proche de 1 avec la méthode par microplaque (article 4).

Tableau 3-3. Comparaison des activités EROD (Log-transformées) mesurées pour les sites de référence de ce travail avec ceux de l'Ardières, de la Durance et de la Moselle (Richert, 1994). Moyenne ± écart-type (N).

			Référence	Ardières	Durance	Moselle
Espèce	Sexe	Saison		(avril-sept. 91)	(mai 91)	(oct 92)
Barbeau	Femelle	Printemps	2,0 ± 1,1 (16)		1,4 ± 0,6 (13)	-
		Automne	2,5 ± 0,6 (13)		-	2,1 ± 0,3 (4)
	Mâle	Printemps	2,2 ± 1,0 (24)		2,1 ± 0,8 (26)	-
		Automne	1,5 ± 0,7 (14)		-	2,2 ± 1,4 (5)
Chevaine	Femelle	Printemps	1,5 ± 0,7 (30)	2,6 ± 0,7 (8)*	1,5 ± 1,0 (16)	-
		Automne	1,2 ± 0,7 (29)	2,4 ± 0,6 (8)*	-	1,6 ± 0,6 (3)
	Mâle	Printemps	2,2 ± 0,8 (25)	2,7 ± 1,1 (2)	2,2 ± 0,9 (24)	-
		Automne	2,1 ± 0,6 (24)	2,9 ± 0,6 (2)*	-	2,4 ± 0,8 (7)
Goujon	Femelle	Printemps	2,0 ± 0,9 (15)	2,5 ± 0,8 (6)		
		Automne	3,0 ± 0,7 (20)	3,2 ± 0,4 (5)		
	Mâle	Printemps	3,3 ± 0,5 (17)	3,6 ± 0,4 (3)		
		Automne	2,8 ± 0,6 (20)	3,7 ± 0,3 (5)*		

* statistiquement différents des valeurs de référence de ce travail au seuil de 5%.

Dans le détail, seuls les résultats de l'Ardières présentent une induction légère comme cela avait été supposé par Richert (1994). Les résultats de la Moselle et de la Durance (avec un échantillonnage conséquent) confirment les nôtres.

La validité des valeurs obtenues en sites de référence peut être aussi testée en évaluant les activités EROD de goujons de pisciculture ou du site de Serrières acclimatés deux mois au laboratoire (Tableau 3-4) selon la méthodologie décrite dans l'article 5.

Tableau 3-4. Comparaison des valeurs EROD (Log-transformées) de référence pour le terrain et le laboratoire chez le goujon. Moyenne ± écart-type (N).

Sexe	Saison	Référence	Pisciculture	Serrières[a]
Femelle	Printemps	2,0 ± 0,9 (15)	1,6 ± 0,8 (8)	
	Automne	3,0 ± 0,7 (20)		2,3 ± 0,9 (9)
Mâle	Printemps	3,3 ± 0,5 (17)	2,2 ± 1,0 (8)	
	Automne	2,8 ± 0,6 (20)		2,6 ± 0,4 (8)

[a]Goujons prélevés à Serrières et gardés durant 2 mois au laboratoire.

On constate que des activités inférieures de 50-100% ont pu être mesurées en laboratoire que ce soit avec des goujons de pisciculture ou du Rhône. On peut donc imaginer que les sites témoins choisis ne sont pas exempts d'un fond d'inducteurs (sauf si l'eau de laboratoire contient des inhibiteurs mais la présence de métaux est contrôlée). Il se peut également que la différence de régime nutritionnel entre terrain et laboratoire explique cette différence. Cette question mériterait donc d'être approfondie.

3.2 Facteurs de variabilité de l'activité EROD *in situ*

3.2.1 Objectifs

Après avoir étudié les activités EROD en milieu peu perturbé par la pollution, il s'agit, en sites pollués, de relier la réponse EROD à l'exposition toxique et aux facteurs biologiques modulateurs (Mayer *et al.*, 1992). Malgré la très grande variabilité naturelle de l'induction de l'EROD, est-il possible de faire la part de ce qui est dû à la contamination ?

3.2.2 Méthodologie

Une fois que la transformation logarithmique de normalisation des données EROD est appliquée, on peut effectuer des régressions linéaires multiples entre les activités EROD et les variables chimiques dont on dispose dans les muscles de poisson. Malgré le spectre très large de micropolluants organiques recherchés, seuls les PCB et les organochlorés (Lindane...) ont été détectés. 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 Gmur, 1981). Les niveaux en PCB sont décrits par la suite par l'intermédiaire du congénère 153 qui est généralement le résidu PCB majoritaire (10-20%) et est considéré comme un bon marqueur de l'ensemble des PCB détectés ou non (De Boer *et al.*, 1993 ; Chevreuil *et al.*, 1995 ; Atuma *et al.*, 1996). Pour les contaminations en PCB des muscles de poisson, un rapport 10 de bioaccumulation est observé entre les sites du Rhône (Rhône 2 notamment) et les sites peu contaminés (Ain, Ardèche et Drôme).

3.2.3 Résultats et discussion

Nous présentons essentiellement les résultats concernant les chevaines, seule espèce dont l'échantillonnage est conséquent. Les données EROD, avant transformation logarithmique, relatives à cette partie, sont rassemblées dans l'Annexe B ou dans le tableau 1 de l'article 4.

3.2.3.1 Induction de l'EROD chez les chevaines et contamination

Pour les chevaines, nous avons observé une relation statistique positive entre l'induction de l'EROD mesurée sur le terrain et la quantité de PCB bioaccumulés dans le muscle en µg/g de matière grasse (Figure 3-3) :

$$\text{Log}\,(1+\text{EROD})_{\text{mâles}} = 1{,}9 + 1{,}4\,\text{Log}(1+\text{PCB153})\ (R^2=0{,}9\ ;\ N=12\ ;\ s=0{,}2\ ;\ p<0{,}01).$$

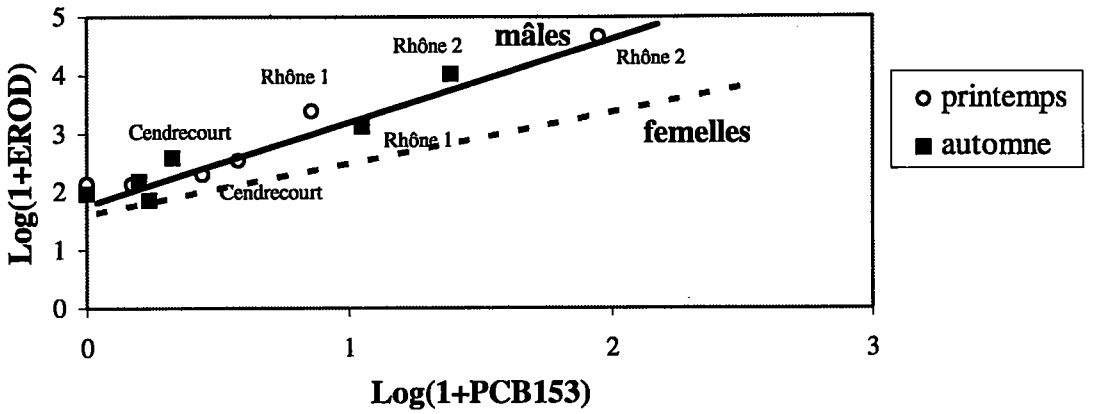


Figure 3-3. Relation EROD-PCB pour le chevaine mâle et deux saisons (campagnes 1995).
L'activité EROD est exprimée en pmol/min/mg de protéines tandis que la concentration en PCB est en µg/g de matière grasse. Une relation du même type pour les femelles au printemps est représentée en pointillés. A l'automne, la différence entre mâles et femelles est atténuée et n'est pas représentée pour les femelles.

De nombreux auteurs ont mis en évidence des corrélations significatives entre l'induction de l'EROD et les concentrations en PCB bioaccumulés (voir le tableau 2 de l'article 2) pour des concentrations de même ordre de grandeur. Les PCB se retrouvent également dans les sédiments et les MES (Tableau 3-5).

Tableau 3-5. Contaminants détectés dans les sédiments et matières en suspension des sites de référence et des sites de la Saône et du Rhône.

mg/kg PS	HAP		PCB		Autres organiques		Métaux (Facteur de pollution)[b]	
	Sédiment	MES[a]	Sédiment	MES[a]	Sédiment	MES[a]	Sédiment	MES[a]
Ain	1,3	NM	0	NM	ND	NM	2,5	NM
Ardèche	0	NM	0	NM	ND	NM	1,4	NM
Drôme	0	NM	0	NM	ND	NM	1,7	NM
Cendrecourt	0,9	NM	0	NM	ND	NM	5,3	NM
Rhône 1	1,0	ND	0,04	ND	huiles minérales	tetrachloroéthylène	2,3	2,2
Rhône 2	1,0	0,15	0,14	0,42	huiles minérales	tetrachloroéthylène, huiles minérales	2,8	1,7

[a]résultats MES aimablement fournis par l'Agence de l'eau RMC.
[b]Moyenne des facteurs de pollution de l'ensemble des métaux dosés. Le facteur de pollution métallique est le rapport entre la concentration mesurée et la concentration de référence.
NM : Non mesuré ; ND : Non détecté.

Van der Oost *et al.* (1997) concluent à une relation statistique significative entre activités de phase I et les PCB mais n'observent pas de corrélation avec les HAP. Pourtant, 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 (Narbonne *et al.*, 1991 ; Lafaurie *et al.*, 1992). Les résultats du Tableau 3-5 indiquent toutefois que les facteurs d'induction observés entre Rhône 1 et 2 et les sites de référence ne peuvent s'expliquer, dans

le cadre de notre étude, par les HAP présents dans les sédiments ou les matières en suspension[34]. Notons d'ailleurs que des anguilles mises en cage dans un site où les sédiments contenaient 1,2 mg HAP/kg ne présentaient pas de différence d'induction par rapport à des anguilles maintenues en laboratoire (Fenet, 1997).

Il se peut donc que les niveaux en HAP détectés, bien que supérieurs aux limites de détection, soient cependant inférieurs à un seuil d'effet biologique significatif. C'est ce que Mc Donald *et al.* (1996) concluent de quatre études : selon ces auteurs, une quantité de 3 mg/kg en HAP est « nécessaire » pour observer une induction significative de l'EROD tandis que les sites témoins ont des concentrations comprises entre 10 et 1000 µg/kg. Pour une contamination en HAP de 1 mg/kg, la fréquence de néoplasmes chez les poissons de la région de Puget Sound (Etats Unis) est de l'ordre de 1% (Malins *et al.*, 1988). La présence de néoplasmes chez les poissons peut cependant être beaucoup plus élevée selon la concentration en HAP des sédiments (Figure 3-4).

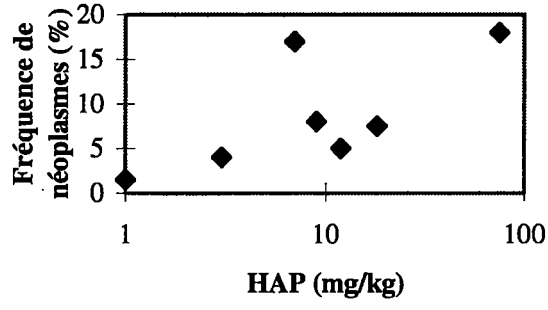


Figure 3-4. Fréquence de néoplasmes chez des poissons exposés in situ à des concentrations croissantes de HAP dans les sédiments (d'après Malins et al., 1988).

3.2.3.2 Induction de l'EROD chez les chevaines et maturité sexuelle des femelles

La liaison entre PCB et induction de l'EROD (Figure 3-3) est différente pour les femelles au printemps du fait de l'influence de la maturation sexuelle. En quantifiant la maturation sexuelle des femelles par le Rapport Gonado Somatique (RGS) on constate alors une relation linéaire décroissante entre le RGS et l'inductibilité relative des femelles par rapport à la moyenne des mâles de la même campagne. Cette relation peut être décrite par

$$\text{ratio} = \frac{\text{Log}(1+\text{EROD})(\text{femelles})}{\text{moyenne}(\text{Log}(1+\text{EROD}))(\text{mâles})} = 1 - 0{,}25\text{Log}(1+\text{RGS})(R^2 = 0{,}2\ ; N = 111\ ; s = 0{,}3\ ; p < 0{,}01)$$

On peut visualiser cette relation sur la figure 3 de l'article 4. Lorsque, en retour, on tient compte de cette relation générale et que l'on « corrige » les activités EROD des femelles selon leur RGS, on constate que le dimorphisme sexuel des chevaines pour l'activité EROD

[34] Un autre prélèvement de sédiment effectué sur l'Ain en 1997 contenait 0,4 mg de HAP par kg de poids sec.

est supprimé quelles que soient la station et la saison (Tableau 3 de l'article 4)[35]. La différence d'activité EROD entre mâles et femelles est également supprimée sur l'ensemble des autres sites étudiés. On peut alors en tirer un avantage opérationnel lorsque l'échantillonnage est faible sur une ou plusieurs stations (ce qui a été le cas pour les stations du RHP en 1995).

Ces résultats confirment que l'activité EROD des poissons femelles est inférieure à celle des mâles et que cette différence disparaît lorsque les gonades sont atrophiées, ce qui confirme le rôle des hormones sexuelles (Stegeman *et al.*, 1987). En particulier, l'injection d'oestradiol provoque une inhibition des monooxygénases (Stegeman *et al.*, 1982 ; Förlin *et al.*, 1984). Ce mécanisme n'est pas encore élucidé (Stegeman et Hahn, 1994). Diverses hypothèses peuvent être avancées : l'oestradiol entrerait en compétition avec le substrat pour le site actif de l'enzyme (inhibition catalytique) (Larsen *et al.*, 1992 ; Arukwe et Goksøyr, 1997), l'oestradiol stimulerait la synthèse de la vitellogénine qui se ferait alors au détriment des autres protéines (dont le cytochrome P450 1A) (Snowberger Gray *et al.*, 1991), ou aurait une influence sur l'expression génique du *CYP1A* (Pajor *et al.*, 1990).

3.2.3.3 Autres facteurs de variabilité potentiels

La température peut jouer un rôle à plus d'un titre par son influence sur la saison de reproduction, sur les phénomènes de bioaccumulation ou sur la cinétique d'induction de l'EROD. Si effectivement certaines études en mer ont montré une influence significative de la température (Sleiderink *et al.*, 1995), en milieu continental rien de tel n'a été observé à ce jour. Avec nos données, une analyse de covariance réalisée avec la température de l'eau lors des pêches et les facteurs espèce, sexe, saison, site, ne détecte pas d'effet significatif de la température, confirmant par là les conclusions de Vindimian *et al.* (1991) sur la Durance.

La taille traduit indirectement l'âge du poisson. Dans le cadre de notre étude, ce facteur pourrait expliquer les activités EROD légèrement plus faibles chez les chevaines mâles que chez les juvéniles. Les autres variables (facteur de condition, rapport hépato-somatique) ne sont pas corrélées avec les activités EROD et ne permettent donc pas d'expliquer la variabilité intra groupe. Cependant, on constate que globalement les facteurs de condition et rapports hépato-somatiques des chevaines à l'aval de Lyon sont supérieurs à ceux des sites de référence sans qu'il y ait de corrélation pour les individus. Compte-tenu, lors de l'interprétation des indices de conditions, des biais statistiques liés à la taille chez les poissons (Wang, 1997 ; Haynes et Brodziak, 1997), on pourrait étudier, pour chaque site, les droites de régression log(poids) en fonction de log(taille).

---

[35] On notera dans cet article, une démarche un peu différente de celle présentée ici. La correction RGS est d'abord appliquée aux femelles puis une relation entre EROD et PCB est étudiée.

3.2.3.4 Résultats pour les barbeaux et les goujons

En ce qui concerne le barbeau et le goujon moins d'informations sont disponibles.

Les goujons prélevés en sites pollués (Rhône 1 et 2 uniquement) présentent, comme les chevaines, des inductions significatives par rapport aux valeurs témoins mesurées en sites de référence (Ain et Ardèche). Le barbeau, en revanche, peu présent dans les sites pollués du Rhône, ne présente pas d'induction de l'activité EROD pour le site de Rhône 1 (pour une campagne de pêche) alors que l'induction est significative pour le site de Rhône 2 (pour une autre campagne de pêche). Les micropolluants organiques présents dans les muscles de barbeau y sont généralement plus abondants que dans les muscles de chevaines du même site (voir par exemple le Tableau 3-2 ou l'article 3).

Chez le barbeau, la différence sexuelle pour l'EROD est moins marquée que pour le chevaine ou le goujon et n'est pas reliée au RGS. Le RGS du goujon n'a pu être mesuré qu'en laboratoire sur des poissons du terrain ou de pisciculture et les résultats confirment l'importance de ce paramètre pour expliquer la différence sexuelle quant à l'EROD pour cette espèce (voir le chapitre 3.3.3.2 ou l'article 5).

3.2.4 Conclusion

Les molécules chimiques dosées dans le cadre de ce travail ne sont pas exhaustives en terme d'inducteurs potentiels. En ce qui concerne les sites de cette étude, l'induction de l'EROD a pu être reliée aux PCB bioaccumulés dans les poissons. Cette observation confirme certaines études mais on ne saurait 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 (Tableau 2 de l'article 1).

La relation observée chez les chevaines femelles entre l'induction de l'EROD et le Rapport gonadosomatique (RGS) confirme l'influence de la maturité sexuelle sur l'induction. Ce résultat permet en plus de quantifier cette influence quel que soit le site et a de ce fait une portée plus générale.

3.3 Quantification en laboratoire des variabilités de l'induction de l'EROD

3.3.1 Objectifs

Les études de terrain sont irremplaçables de par l'information réelle qu'elles donnent sur le milieu. Toutefois, nous avons voulu compléter les connaissances sur l'induction par des expériences de laboratoire sur des espèces susceptibles d'être échantillonnées sur le terrain. En outre, certaines questions sont matériellement impossibles à étudier sur le terrain et

doivent être abordées en laboratoire dans des conditions qui permettent de contrôler les facteurs.

Nous avons ainsi choisi d'étudier en laboratoire, sur une espèce de cyprinidé (le goujon), l'influence des facteurs : dose d'inducteur, maturité sexuelle et histoire de l'exposition du poisson à des inducteurs. Ces expérimentations sont réalisées avec les objectifs suivants :

- Comment se situent les activités EROD mesurées chez le goujon dans les sites étudiés (pollués ou non) par rapport à une gamme d'induction de l'EROD en laboratoire ?
- L'influence de la maturité sexuelle des femelles est-elle quantitativement confirmée en laboratoire ?
- Quelle est l'influence du facteur temps (histoire) sur l'induction (réversibilité et sensibilité) ?

3.3.2 Méthodologie

Nous avons choisi, parmi les trois espèces de cyprinidés, le goujon qui est le meilleur candidat de par sa petite taille et la possibilité d'approvisionnement en pisciculture. Les résultats ci-après concernent également des goujons prélevés dans l'Ain (site peu pollué) ou dans le Rhône (site Rhône 2) pour les expériences concernant l'influence de la pré-exposition des poissons notamment.

3.3.3 Résultats et discussion

3.3.3.1 Relation EROD-dose d'inducteur

Une première étude d'inductibilité de l'activité EROD du goujon a été réalisée avec des doses croissantes de bNF (Figure 3-5) et dissection 4 jours après l'injection. On constate que les niveaux maximums d'induction sont de l'ordre de ceux mesurés sur le site de Rhône 2 avec des goujons de terrain, tandis que les niveaux témoins sont légèrement inférieurs à ceux mesurés sur le terrain en sites non pollués (pour le détail des résultats se reporter à l'article 5).

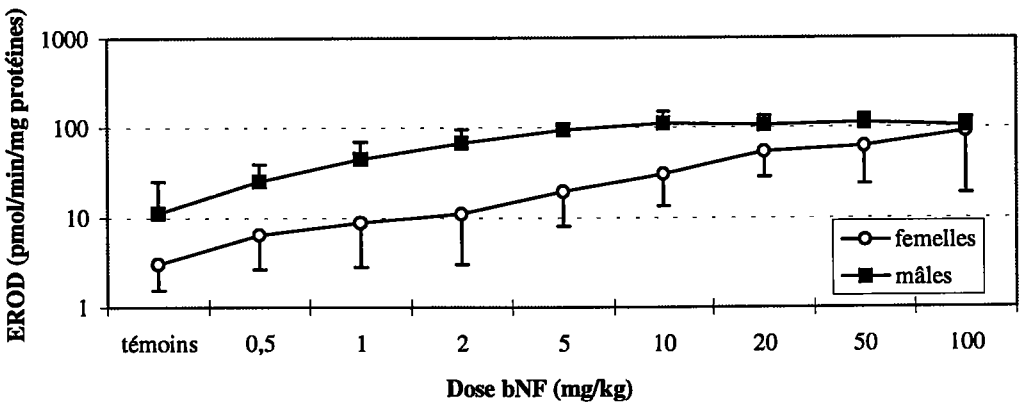


Figure 3-5. Relation EROD-bNF pour le goujon de pisciculture. Les moyennes géométriques et les intervalles de confiance à 95% sont figurés.

Cette relation dose-réponse de l'induction, avec des minimums et maximums cohérents avec des niveaux de terrain, permet de quantifier le « cadre » de variation de l'induction de l'activité EROD du goujon pour les femelles et les mâles.

3.3.3.2 Influence du sexe sur l'induction de l'activité EROD chez le goujon

On note que les femelles sont moins inductibles que les mâles. En effet, les femelles provenant de la pisciculture étaient en période de maturité sexuelle. Une relation EROD et RGS du même type que pour les chevaines de terrain a d'ailleurs été trouvée avec les goujons de laboratoire[36] :

$$\text{ratio} = \frac{\text{Log}(1+\text{EROD})(\text{femelles})}{\text{moyenne}(\text{Log}(1+\text{EROD}))(\text{mâles})} = 1{,}3 - 0{,}35\text{Log}(1+\text{RGS})(R^2 = 0{,}5\ ;\ N = 86\ ;\ s = 0{,}2;\ p < 0{,}05)$$

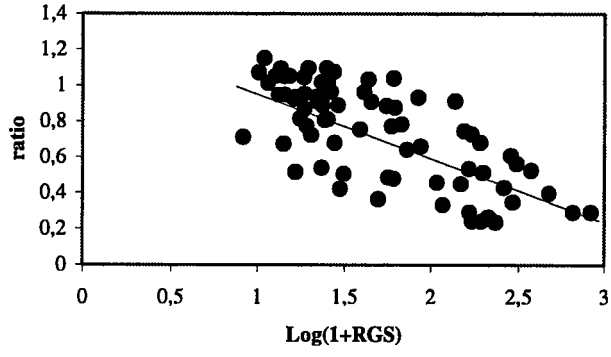


Figure 3-6. Relation EROD-RGS pour les goujons femelles en laboratoire.

Comme pour les chevaines, l'utilisation de cette relation (connaissant les RGS des femelles) permet de « gommer » la différence mâle-femelle quant à l'induction de l'EROD. Nous avons vérifié qu'avec des goujons de terrain (Rhône 2) la relation était identique (article 5). D'autre part, la prise en compte du RGS des femelles permet de diminuer la variance résiduelle (non-expliquée par l'espèce, le site, le sexe, ou la saison) de 51% à 38% de la variance totale (article 5).

3.3.3.3 Influence du facteur temps sur l'induction

Dans l'optique d'utiliser la mesure de l'activité EROD comme outil de biosurveillance, il est impératif d'étudier la sensibilité de la réponse à une nouvelle induction ainsi que la cinétique de retour au niveau de base de l'induction. Ces études, permettant d'aborder l'influence sur l'induction de l'activité EROD, de l'histoire de l'exposition du poisson à des

[36] La relation entre EROD et RGS dépend de la dose de bNF (tableau 1 de l'article 5) mais l'utilisation du ratio permet d'avoir une relation plus générale.

polluants, ont pu être réalisées avec des goujons de laboratoire comme avec des goujons prélevés en sites pollués ou non.

Contrairement aux expériences de laboratoire précédentes, nous avons profité de la possibilité de prélever sur le terrain des chevaines juvéniles en plus des goujons. Leur taille permet, contrairement aux chevaines adultes, une stabulation en laboratoire dans de bonnes conditions. Mais leur caractère immature ne permet pas de tester en laboratoire l'effet de la maturité sexuelle des chevaines sur l'activité EROD.

Un essai d'inductibilité sur ces cyprinidés prélevés sur les sites de l'Ain et de Rhône 2 a tout d'abord montré l'influence de la pré-exposition des poissons sur leur capacité à répondre à une nouvelle exposition (Figure 3-7).

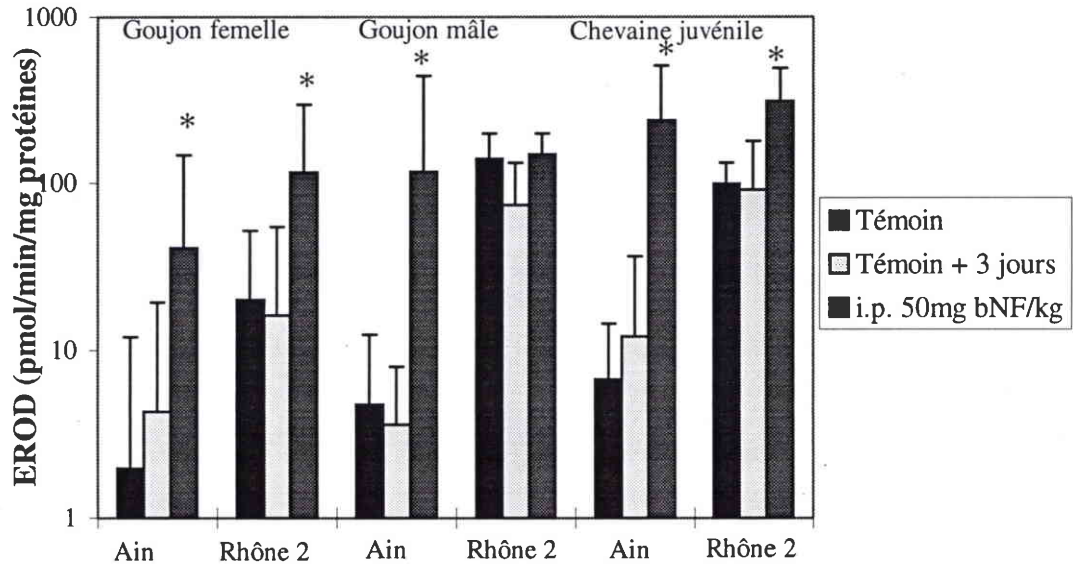


Figure 3-7. Effet sur l'activité EROD (pmol/min/mg de protéines) de l'injection intrapéritonéale de 50mg/kg de bNF à des goujons de l'Ain et de Rhône 2 et dissection 3 jours après l'injection. Les moyennes géométriques et les intervalles de confiance à 95% sont figurés. L'étoile (*) indique une différence statistiquement significative (p<0,05) par rapport aux témoins.

On constate que les goujons mâles de Rhône 2, qui ont une activité EROD de l'ordre du maximum mesuré en laboratoire (100 pmol/min/mg de protéines) (Figure 3-5), ne répondent pas à une nouvelle induction (artificielle) (Figure 3-7)[37]. En revanche, les autres groupes de goujons (mâles de l'Ain et femelles) ont une activité EROD inductible par la bNF jusqu'au plateau de l'induction de l'EROD chez les goujons. Les chevaines, qu'ils proviennent de l'Ain ou du Rhône, ont des activités EROD induites par la bNF qui sont similaires, ce qui laisserait penser qu'un maximum d'induction a été atteint (et dans ce cas avec un ordre de grandeur supérieur à celui des goujons).

[37] La durée de stabulation de 3 jours au laboratoire n'est pas suffisante pour observer une diminution de l'activité (poissons témoins).

Dans la même optique d'étude de la "sensibilité" de ce biomarqueur, nous avons testé la réversibilité du phénomène d'induction sur des poissons prélevés sur le site de Rhône 2 et gardés en stabulation en eau de laboratoire pendant deux mois (Figure 3-8).

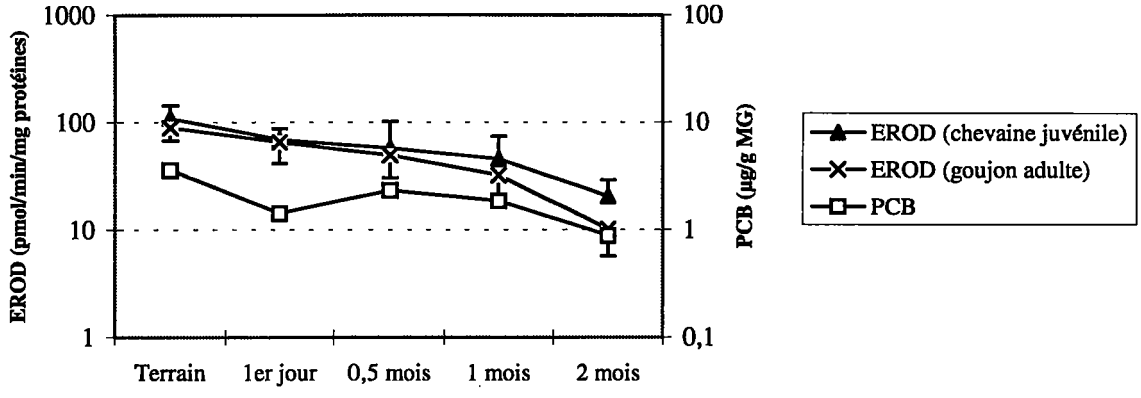


Figure 3-8. Etude de la réversibilité de l'induction de l'activité EROD (pmol/min/mg de protéines) de goujons de Rhône 2 en laboratoire. Les moyennes géométriques et les intervalles de confiance à 95% sont figurés. Les PCB (quantifiés en Aroclor 1254) ont été dosés dans les muscles de goujon.

On constate que l'activité des goujons décroît progressivement pour rejoindre les niveaux des témoins (10 pmol/min/mg de protéines) au bout de deux mois de stabulation[38]. La concentration de PCB dans les muscles de goujons diminue également. Enfin, l'activité EROD de ces goujons « épurés » répond à une injection de 50 mg/kg d'Aroclor 1254 de la même façon que celle des goujons de pisciculture (Tableau 3 de l'article 5).

L'influence de l'historique de l'exposition des poissons a été testée sur les goujons de pisciculture avec le cas particulier de la bNF. On observe alors que, 32 jours après une induction de 50 mg/kg de bNF, l'activité EROD a baissé (au niveau des témoins pour les femelles)(article 5). Si l'on traite à nouveau ces poissons avec le même inducteur sur une durée de 4 jours l'activité EROD est induite fortement avec 50 mg/kg mais l'induction est peu ou pas significative pour une dose de 1 mg/kg (Tableau 3-6).

Tableau 3-6. Activités EROD (pmol/min/mg protéines) de goujons témoins et de goujons traités à la bNF (32 jours) après une nouvelle injection de bNF (4 jours). Les moyennes géométriques et les intervalles de confiance à 95% sont présentés. (significativement différent des poissons témoins ($p<0.05$)).*

	Femelles			Mâles		
	témoins	1 mg/kg	50 mg/kg	témoins	1 mg/kg	50 mg/kg
poissons témoins	4 (2-7)	9 (4-16)	54 (24-120)	12 (7-17)	44 (29-72)	109 (90-134)
poissons pré-traités	6 (3-12)	14 (6-35)	70 (44-108)	29 (15-54)*	63 (29-120)	98 (59-163)

[38] Il en est de même avec les chevaines juvéniles pour lesquels Log(1+EROD) = 2,9 ± 0,4 (8).

Les activités EROD obtenues étant du même ordre que celles obtenues avec des poissons sans pré-traitement, on peut considérer que, malgré la pré-exposition des poissons à la bNF, ceux-ci sont capables de répondre à une nouvelle induction par la bNF et cela dans le même ordre de grandeur.

3.3.4 Conclusion

Ces expériences de laboratoire ont permis d'estimer la plage de variation de l'induction de l'EROD pour le goujon dans le cas de l'induction par la bNF. Avec cette espèce, l'influence de la maturité sexuelle des femelles a été confirmée et quantifiée.

D'autre part, des expérimentations sur des goujons de pisciculture et des poissons provenant du milieu naturel ont tenté d'appréhender l'influence de l'historique de l'exposition à des inducteurs. Ces questions sont délicates tant les temps d'accumulation et de métabolisation dépendent de la nature chimique de l'inducteur. Il peut ainsi être jugé présomptueux de « mélanger » une induction par la bNF à une induction inconnue du milieu naturel. Cependant, nos résultats permettent de conclure que la rémanence de l'induction par la bNF est de l'ordre du mois et que la rémanence de l'induction dans le site de Rhône 2 est de l'ordre du double[39]. D'autre part, nous avons montré que la pré-induction artificielle ou « naturelle » (terrain) ne remet pas en cause l'inductibilité des poissons lorsque l'induction est revenue à un niveau faible. Ces résultats ont ainsi un intérêt opérationnel.

3.4 Etude de cas d'inhibition de terrain et de laboratoire

3.4.1 Objectifs

Un certain nombre de composés (dont certains métaux lourds) sont susceptibles d'inhiber l'activité EROD. Malgré l'intérêt scientifique de cette question, les études portant sur ces mécanismes d'inhibition sont rares. Dans notre laboratoire, une expérimentation a montré que des concentrations "environnementales" de cuivre ou de méthidation (pesticide organophosphoré) étaient susceptibles d'inhiber l'activité EROD (article 6). Plusieurs auteurs ont également signalé ces phénomènes *in situ* : par exemple, l'activité EROD dosée sur des individus pêchés sur les stations les plus proches des rejets peut être plus faible que celle mesurée plus en aval (Lindström-Seppä et Oikari, 1990).

L'utilisation simultanée, sur les mêmes individus, de méthodes de mesure complémentaires (mesures de l'induction de la protéine P4501A par détection immunochimique et par quantification de l'activité catalytique EROD) pourrait permettre de

[39] Cette dernière étant cohérente avec la décroissance du niveau de PCB bioaccumulés.

mettre en évidence de tels phénomènes contradictoires, en liaison avec la présence de composés inhibiteurs (Goksøyr et Förlin, 1992).

3.4.2 Méthodologie

Nous avons donc estimé l'intérêt de la détection immunochimique dans le cas de situations de terrain où l'hypothèse d'une inhibition de l'induction de l'EROD pouvait être émise, et où des données de bioaccumulation de métaux dans les poissons étaient heureusement disponibles (Morand, 1997). D'autre part, nous avons renouvelé, sur le goujon, l'expérience de laboratoire décrite dans l'article 6 afin d'évaluer l'intérêt de la détection immunochimique dans le cas de l'inhibition de l'activité EROD par un organophosphoré (le méthidathion) (article 7).

3.4.3 Résultats et discussion

3.4.3.1 Confrontation de résultats de terrain

En ce qui concerne les chevaines mâles, nous avons testé la validité de la relation EROD-PCB (Figure 3-3) sur d'autres sites et d'autres campagnes[40] (Figure 3-9) : des résultats obtenus sur certains sites (Collonges, Givors et Trévoux) diffèrent de la relation précédente (notée en pointillés) tandis que les échantillonnages effectués en 1996 sur l'Ain, Rhône 1 et Rhône 2 l'ont confirmée[41].

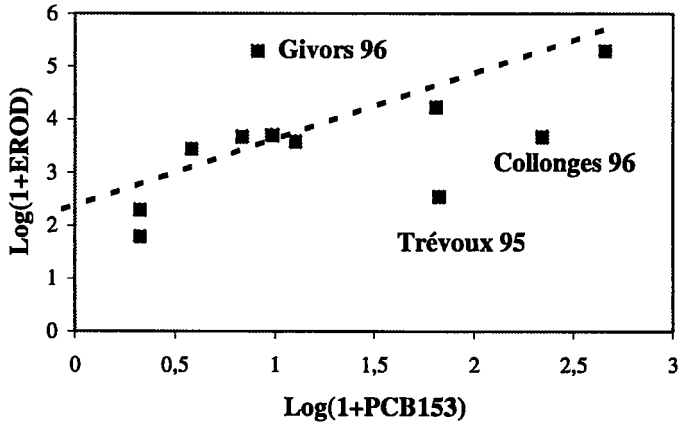


Figure 3-9. Validation de la relation EROD-PCB (en pointillés) pour d'autres campagnes.
L'activité EROD est exprimée en pmol/min/mg de protéines tandis que la concentration en PCB est en µg/g de matière grasse. La relation en pointillés correspond à celle des mâles de la Figure 3-3.

[40] Sites de l'Ain, Rhône 1 et Rhône 2 en 1996 ainsi que les stations du RHP en 1995 et 1996.

[41] En tenant compte de ces nouveaux points, $\text{Log (1+EROD)}_{\text{mâles}} = 2{,}0 + 1{,}2\ \text{Log(1+PCB153)}$ (R^2=0,8 ; N=20 ; s=0,4 ; p<0,01).

Les résultats qui présentent une activité EROD inférieure à celle potentiellement expliquée par les PCB (Collonges 96 et Trévoux 95) pourraient s'expliquer par l'exposition des poissons à des inhibiteurs de l'EROD comme les métaux et certains pesticides présents en quantité dans la Saône[42]. Le cuivre est connu comme réducteur de l'induction de l'activité EROD *in vivo* et *in vitro* (article 6 ; Stien *et al.*, 1997). Le zinc également provoque une inhibition de cette activité enzymatique *in vitro* (Asokan *et al.*, 1985). Or, par exemple, des quantités en cuivre et en zinc plus élevées sont détectées dans les chevaines de la Saône par rapport à ceux du Rhône (Figure 3-10) (Morand, 1997). Le point Givors 96 pourrait en revanche témoigner d'une induction ponctuelle due à un polluant dont on ne retrouve pas la mémoire dans les muscles de poisson (les hydrocarbures notamment)[43].

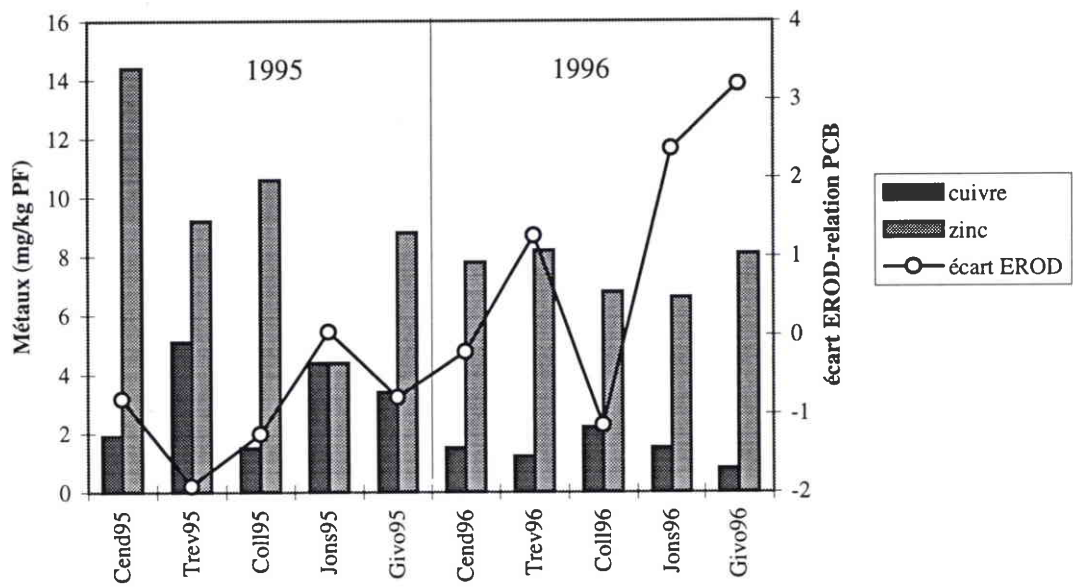


Figure 3-10. Comparaison de l'écart entre l'induction de l'activité EROD observée (en Log) et l'induction prévue par la relation de la Figure 3-3 selon la quantité de PCB bioaccumulés avec le cuivre branchial et le zinc musculaire (mg/kg de poids frais) sur les stations du RHP en 1995 et 1996.

Les écarts d'induction de l'EROD par rapport aux niveaux prédits, par la relation de la Figure 3-3 pour ces quantités de PCB bioaccumulés, pourraient donc s'interpréter en terme de quantité de cuivre et de zinc bioaccumulés. Une étude de régression entre cet écart et les logarithmes des concentrations en cuivre et en zinc confirme une influence significative de ces deux métaux (R^2=0,7 ; N=10 ; s=1,0 ; p<0,01). Des études de laboratoire approfondies (avec mesures individuelles des concentrations en cuivre et en zinc et de l'induction de l'EROD) permettraient de vérifier une éventuelle causalité.

---

[42] La rivière de l'Ardières, drainant un bassin viticole du Beaujolais, se jette dans la Saône quelques kilomètres avant Trévoux. Cette rivière est particulièrement contaminée par les métaux et les pesticides (Faessel *et al.*, 1993 ; Richert, 1994).

[43] Le point Givors , contrairement à Vernaison, est à l'aval du « couloir de la chimie » au sud de Lyon.

3.4.3.2 Résultats de mesure immunochimique sur des poissons de terrain

Des premiers résultats ont montré le croisement d'un anticorps monoclonal anti P450 1A de morue avec les protéines de barbeau, de chevaine et de goujon (chapitre 2.6).

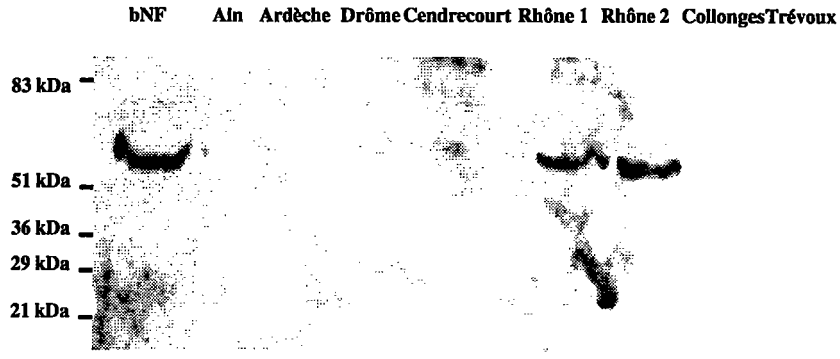


Figure 3-11. Détection immunochimique par un anticorps anti P450 1A de morue des protéines de chevaines dans des sites du bassin du Rhône. Des microsomes de foie de chevaines induits par 50 mg/kg de bNF ont été déposés comme témoin.

En ce qui concerne le chevaine, cette méthode permet de distinguer les sites pollués du Rhône des sites peu pollués (Figure 3-11). Elle confirme que les niveaux faibles d'activité EROD mesurés sur l'Ain, l'Ardèche et la Drôme ne résultent pas d'une inhibition catalytique par des polluants. C'est également le cas pour les sites de Trévoux et de Collonges.

Ces travaux ont par ailleurs confirmé chez le goujon la forte induction du site de Rhône 2 par rapport à celui de l'Ain. La sensibilité de la détection immunochimique est cependant moindre que celle de la mesure de l'EROD. En effet, chez le goujon, l'induction de l'EROD par une dose de 0,5 mg/kg de bNF est détectable tandis que l'induction par la même dose n'est pas détectable par voie immunochimique (article 5).

3.4.3.3 Inhibition catalytique chez le goujon par le méthidathion

Des goujons de pisciculture ont été exposés pendant 96 heures à des concentrations environnementales de méthidathion (3 ; 10 ; 30 µg/l) après une induction par la bNF à une dose de 5 mg/kg. Les résultats montrent une réduction de l'induction de l'EROD de l'ordre de 60% pour 30 µg/l de Méthidathion (Figure 3-12). Une telle inhibition est constatée *in vitro* mais seulement à des concentrations élevées (20 mg/l) de l'ordre de 10% de la limite de solubilité du Méthidathion (contrairement à ce qui est observé avec le cuivre) (article 7). En revanche, l'étude par voie immunochimique ne détecte aucune inhibition de l'induction *in vivo* mais plutôt une légère induction (Figure 3-12). Ces résultats confirment l'hypothèse

d'une inhibition catalytique par le méthidathion avec un mécanisme qui pourrait être analogue à celui du parathion[44].

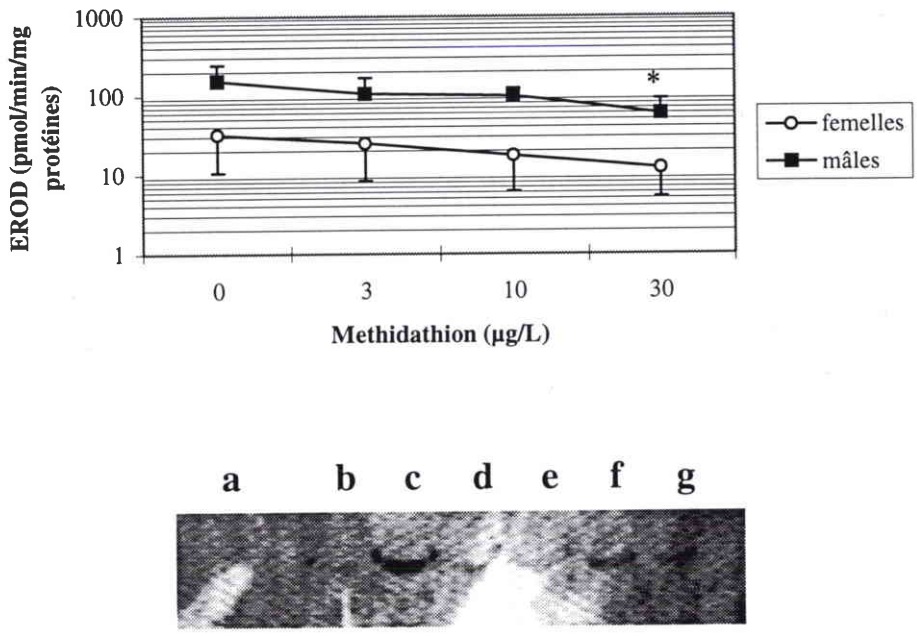


Figure 3-12. Inhibition de l'induction de l'EROD chez le goujon par le méthidathion, infirmée par la détection immunochimique réalisée sur les mêmes poissons dans les mêmes conditions. Les moyennes géométriques de l'activité EROD et les intervalles de confiance à 95% sont figurés.

a-c : 0 ; 5 ; 50 mg bNF/kg. d-g : 0 ; 3 ; 10 ; 30 µg MD/L après injection de 5 mg bNF/kg.

3.4.4 Conclusion

Le croisement des informations EROD et PCB a permis de détecter des sites dont l'analyse de contaminants dans les poissons a confirmé la présence de métaux susceptibles d'inhiber l'activité EROD. Pour ces sites (Collonges et Trévoux), la protéine P450 1A n'était pas détectable par voie immunochimique. En revanche, dans le cas de l'inhibition par le méthidathion, on observe une légère induction de la protéine ce qui indiquerait que le mécanisme d'action de cet organophosphoré est une inhibition catalytique.

[44] Mécanisme d'inhibition décrit en introduction générale (Figure 1-4).

3.5 Situation de l'EROD par rapport à d'autres mesures chimiques ou biologiques

3.5.1 Objectifs

Selon les sites et les campagnes d'échantillonnage, d'autres données, biologiques et chimiques, sont parfois disponibles. Elles sont susceptibles d'être mises en relation par des techniques d'analyse de données. Même si la comparaison de données aussi différentes par nature que EROD, facteur de condition, indice oligochètes, IBGN, contamination des sédiments et des MES...ne peut certainement pas être féconde en terme de causalité, elle peut toutefois permettre de situer des sites par rapport à d'autres, c'est à dire faire une typologie reposant sur des informations chimiques et biologiques.

3.5.2 Résultats et discussion

3.5.2.1 EROD et génotoxicité

Conjointement à la mesure de l'EROD en 1996 sur les trois sites de l'Ain, de Vernaison et de Serrières, la mesure des cassures simple brin d'ADN par l'essai comètes (Devaux *et al.*, 1997), qui traduit un effet génotoxique des polluants, a été réalisée sur les erythrocytes des mêmes chevaines (article 8).

Les chevaines présentent à Serrières une induction de l'EROD qui est significativement supérieure à celle mesurée sur les chevaines de Vernaison. En revanche, l'effet génotoxique est statistiquement identique à Vernaison et à Serrières, mais supérieur à celui enregistré sur les poissons de l'Ain (article 8)[45].

Le suivi de l'évolution de l'activité EROD et du niveau Comètes sur des chevaines juvéniles ramenés au laboratoire (expérience de la Figure 3-8) pendant 2 mois montre que ces deux indicateurs baissent respectivement de 70% et 87% avec une diminution plus rapide pour le taux de cassures simple brin de l'ADN (article 8).

Ces premières expériences montrent l'intérêt d'une utilisation multi-biomarqueurs et seront poursuivies dans l'avenir.

[45] Dans cet article, la station 2 correspond à Vernaison, tandis que la station 3 correspond à Serrières.

3.5.2.2 EROD et bilan sanitaire des chevaines

Les études réalisées en 1995 et 1996 sur 5 sites du Rhône et de la Saône dans le cadre du RHP ont permis la comparaison de données EROD avec des données de parasitologie, bactériologie, biochimie sanguine ainsi qu'avec des données chimiques (métaux et organiques bioaccumulés) (Morand, 1997).

A cette occasion, un indice moyen de parasitologie a été proposé. Cet indice synthétique tient compte des pouvoirs pathogènes des parasites mis en cause, et du taux de poissons parasités.

On peut, avec précaution, porter sur un même graphique les résultats de l'activité EROD et de l'indice moyen de parasitologie (Figure 3-13). On observe alors une tendance commune sur les sites et les deux campagnes[46]. Cette tendance pourrait traduire l'influence d'une cause commune polluante responsable d'une induction de l'activité EROD d'une part et d'une moindre résistance à l'infestation par les parasites d'autre part.

Conjointement, un certain nombre de mesures de biochimie sanguine ont été réalisées[47]. Parmi ces mesures, l'inhibition de l'activité lysozyme (dosée dans le plasma selon Siwicki *et al.*, 1996) est le signe d'un effet immunotoxique[48] (Weeks *et al.*, 1992). On observe sur les données de 1996 du RHP (Figure 3-13), que plus l'induction de l'activité EROD est élevée et plus l'activité lysozyme est inhibée.

Ces résultats préliminaires nécessitent une validation poussée. Ils méritaient cependant d'être présentés.

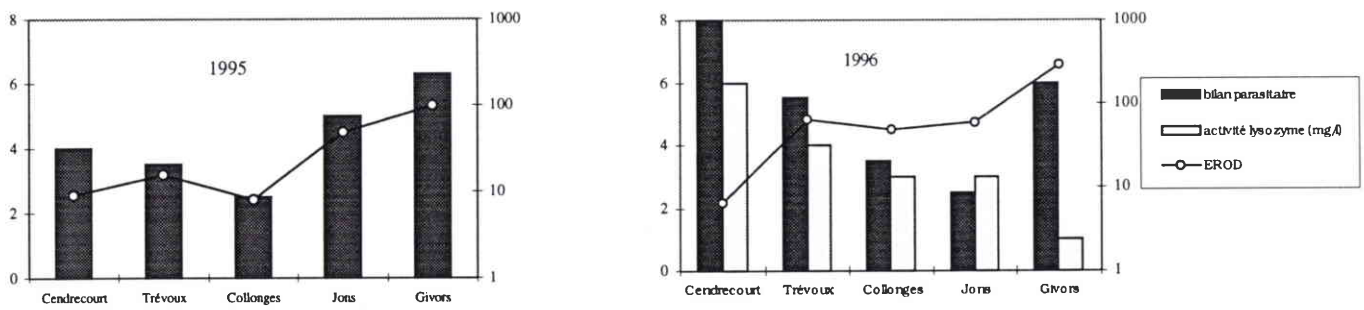


Figure 3-13. Comparaison des résultats EROD avec le bilan parasitaire des chevaines (95-96) et avec l'activité lysozyme (96).

[46] Sauf Cendrecourt en 1996 où un effet de la contamination métallique pourrait se faire sentir.

[47] Protéines totales, immunoglobulines, lysozyme, céruloplasmine.

[48] Le lysozyme intervient dans la destruction initiale des agents invasifs (Weeks *et al.*, 1992).

3.5.2.3 Quel lien avec les résultats sur les populations ?

En terme de compréhension de la « cascade » d'effets, de l'exposition à la mort en passant par des effets sur la reproduction, il est intéressant d'étudier les liens entre l'induction de l'activité EROD et des effets biologiques plus intégrés.

Par exemple, deux études sur des sites ateliers du Rhône ont utilisé les deux approches « biomarqueur » et « population » sur les cyprinidés. Dans le secteur de Vernaison-Rhône 1 (Valentin, 1997), le peuplement de poissons est apparu déséquilibré (dominance d'un petit nombre d'espèces, faible abondance de certaines espèces sensibles). La situation dans le secteur de Serrières-Rhône 2 (Valentin *et al.*, 1997) est encore moins riche et moins diversifiée. Ces résultats peuvent être mis en parallèle avec des résultats d'induction de l'EROD sur ces sites. Les inductions de l'activité EROD sont en effet plus importantes dans le secteur de Rhône 2 que dans celui de Rhône 1 pour les chevaines (voir par exemple la Figure 3-3).

En ce qui concerne les populations de poissons, les conditions d'habitat, essentiellement physiques, sont également des facteurs prépondérants dans l'interprétation des résultats et il est délicat d'expliquer ces déséquilibres par le seul facteur pollution responsable de l'induction de l'EROD mesurée (Valentin *et al.*, 1997) sauf à suivre ce site sur une dizaine d'années.

3.5.2.4 Données EROD 1991-1996 et autres descripteurs biologiques ou chimiques

Enfin, les résultats obtenus lors des études réalisées par le laboratoire sur les sites de la Durance (Vindimian *et al.*, 1991 ; Richert, 1994), de l'Ardières (Vindimian *et al.*, 1993 ; Richert, 1994) et de la Moselle (Garric *et al.*, 1994) peuvent être situés les uns par rapport aux autres. En particulier, la validité des zones amont de ces études par rapport aux valeurs témoins (Ain, Ardèche, Drôme) a déjà été discutée ci-dessus (chapitre 3.1.4).

Le regroupement d'informations biologiques et chimiques concernant ces sites a abouti au Tableau 3-8 (page suivante). Parallèlement à la mesure de l'activité EROD des chevaines, on dispose donc de descripteurs biologiques : facteur de condition des chevaines (FC), indice oligochète (IOBS) et IBGN. Les significations des deux indices de bioévaluation : IBGN (fondé sur les familles de macro-invertébrés) et IOBS (fondé sur les oligochètes) sont données dans le Tableau 3-7). Par ailleurs, les résultats de contamination chimique concernent les métaux, les PCB et les HAP dans les sédiments. Ces valeurs ont été sélectionnées en prenant soin de ne retenir que celles obtenues à une date la plus proche possible (à une année près) de celle de la mesure de l'activité EROD.

Tableau 3-7. Classes de qualité basées sur les indices IBGN et IOBS.

Classe	IBGN[a]		IOBS[b]	
1	>17	excellente qualité hydrobiologique	>4	Bonne qualité biologique des sédiments ou légère charge organique
2	13 à 16	bonne qualité hydrobiologique	3 à 4	Pollution sensible de nature organique. Qualité biologique moyenne
3	9 à 12	Qualité hydrobiologique moyenne	2 à 3	Qualité biologique médiocre
4	5 à 8	Qualité hydrobiologique médiocre	1 à 2	Qualité biologique mauvaise
5	<4	Hors classe	<1	Qualité biologique très mauvaise

[a]Grille de qualité de l'Agence de l'eau RMC.

[b]D'après Lafont (1989).

Tableau 3-8. Données chimiques et biologiques sur des sites du bassin du Rhône et de la Moselle.

Site	Année	EROD[a]	FC[a]	IOBS[b]	IBGN	Métaux[c]	PCB[d]	HAP[d]
Ain	1995-96	2,1	1,3	2,9	16	2,5	0	1,33
Ardèche	1995-96	2,1	1,2	-	16	1,4	0	0
Drôme	1995-96	1,9	1,2	-	17	1,7	0	0
Cendrecourt	1995-96	2,2	1,3	3,6	12	5,3	0	0,94
Trévoux	1995-96	3	1,4	-	10	2,1	-	-
Collonges	1995-96	3,6	1,4	2,9	9	2,5	0	1,32
Jons	1995-96	3,5	1,3	2,3	16	2,2	0	0,60
Vernaison	1995-96	3,4	1,4	-	-	2,3	0,04	0,96
Givors	1995-96	4,7	1,6	1,8	10	3,1	0,93	1,71
Serrières	1995-96	4,3	1,4	-	-	2,8	0,14	1,00
Eloyes	1992	2,4	1,2	2,9	9	2,3	0,02	1,80
Dinoze	1992	2,9	1,2	1,2	-	2,5	0,01	3,46
Chavelot	1992	3,6	1,2	1,2	-	4,4	0,01	2,42
Bainville	1992	3,6	1,3	1	-	3,2	0,01	1,33
Velle s/Moselle	1992	3,7	1,2	2,1	-	2,9	0,01	0,61
Thèze	1991	2	1,3	2,3	14	0,9	-	-
Bons Enfants	1991	2,1	1,5	1,4	16	0,8	-	-
Bléone	1991	1,7	1,4	3,7	-	0,9	-	-
Verdon	1991	3,5	1,4	1,3	-	0,6	-	-
Brillanne	1991	5,3	1,4	1,2	14	1,7	-	0,40
Manosque	1991	5,2	1,3	1,1	11	-	-	-
Peyrolles	1991	2,4	1,3	1,7	19	1,4	-	-
Roque d'Anthéron	1991	3	1,5	1,7	15	0,9	-	-

[a]Moyennes pour les chevaines mâles. Les données EROD sont Log-transformées.

[b]IOBS : indice oligochète (Lafont, 1989 ; Lafont et Mouthon, 1990 ; Lafont *et al.*,1996a et b).

[c]Facteur de pollution moyen pour les 8 métaux dosés dans les sédiments.

[d]en mg/kg de poids sec de sédiment.

On peut ainsi illustrer à l'aide d'une Analyse en Composantes Principales les positions des différents sites dans le plan créé à l'aide des variables suivantes : EROD, FC, HAP, Métaux et PCB (Figure 3-14)[49]. On observe un axe de pollution corrélé aux variables biologiques et chimiques. Cet axe oppose fortement les sites de la Drôme et de l'Ardèche aux sites de Serrières et Chasse (Givors). Un deuxième axe métallique distingue notamment Cendrecourt.

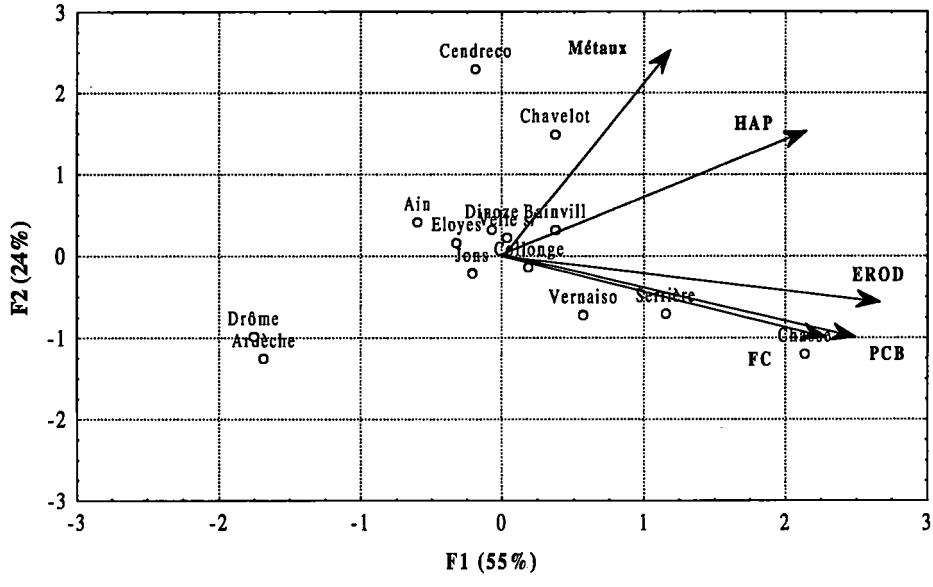


Figure 3-14. Analyse en Composantes principales des données du Tableau 3-8.

Enfin, on peut situer le « diagnostic EROD » par rapport aux deux indices de bioévaluation : l'IBGN et l'indice oligochètes (IOBS) (Figure 3-15, page suivante). Ces deux variables n'ont pas été intégrées dans l'analyse en composantes principales précédente en raison des valeurs manquantes dans le tableau de données. Ainsi, pour comparer ces trois mesures, nous les avons normalisées en les centrant par rapport à leur moyenne et en les réduisant par rapport à leur écart-type.

[49] Cette analyse n'est présentée ici qu'à titre illustratif.

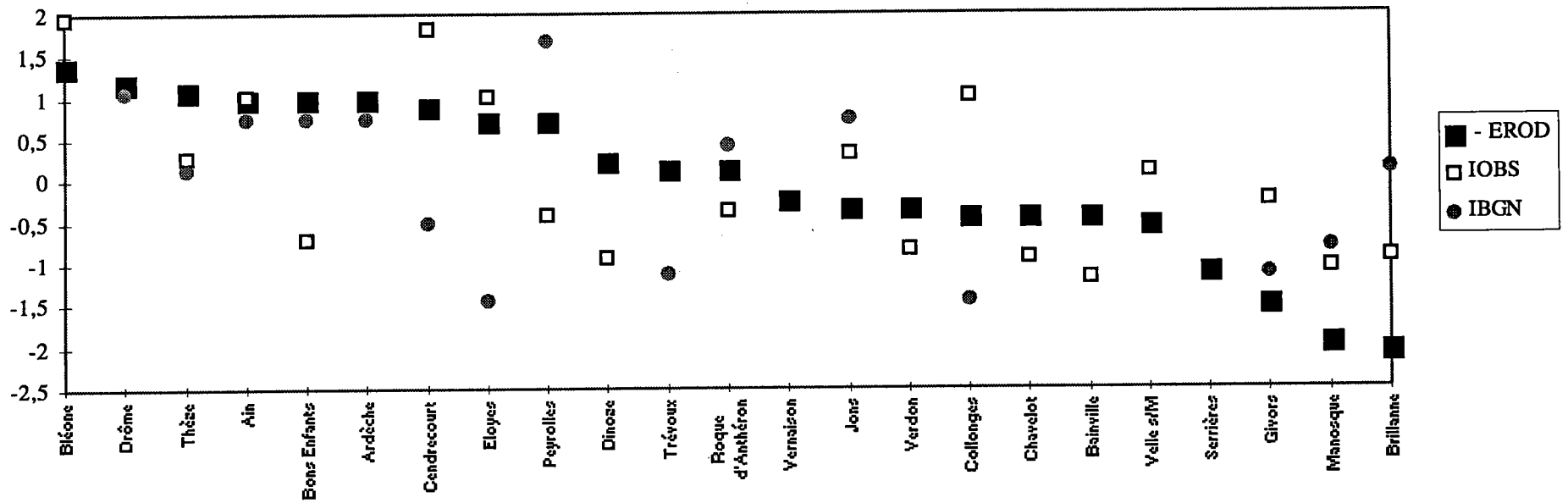


Figure 3-15. Comparaison des résultats des valeurs EROD, IBGN et IOBS pour 23 stations.
Les valeurs EROD ont été obtenues sur les chevaines mâles et ont été portées en négatif, et l'IBGN comme l'IOBS sont les valeurs obtenues pour la date la plus proche de la mesure EROD correspondante.

Ainsi, de manière extrêmement globale, l'activité EROD est faible pour les sites où l'IBGN et l'IOBS sont élevés : sites de bonne qualité écologique. De même, l'activité EROD est élevée pour les sites où les deux indices de bioévaluation sont faibles : mauvaise qualité écologique.

Dans le détail, on observe toutefois quelques sites où une faible induction va de paire avec une mauvaise qualité écologique : Cendrecourt, Eloyes, Trévoux...Cette constatation pourrait s'expliquer par une pollution « non-inductrice » (métaux), ou par une dégradation physique du milieu.

On peut également noter d'autres sites où une induction de l'EROD est détectée sans qu'il y ait de dégâts importants observés sur les invertébrés : Brillanne, Jons...Dans ce cas, la mesure de l'EROD détecte éventuellement l'exposition à des polluants dont les effets irréversibles ne se font pas (encore) sentir.

C'est dans les cas de non concordance de la mesure de l'EROD avec ces indices que la complémentarité est féconde.

3.5.3 Conclusion

L'opportunité d'avoir pu rassembler sur les mêmes poissons des informations biologiques de différents niveaux d'organisation a permis la discussion de liens éventuels entre l'induction de l'EROD, des informations sur les peuplements de poissons et un bilan sanitaire des poissons. Ce type de résultat mérite d'être présenté même si la démonstration d'un rapport de causalité nécessiterait des études supplémentaires. En tout état de cause, des informations biologiques et chimiques, portées dans un même tableau de données, permettent de dresser une typologie des sites sur lesquels une information EROD est disponible.

3.6 Vers des classes de « qualité EROD »

3.6.1 Objectifs

On peut tirer de la description statistique des activités EROD des conséquences pratiques concernant l'échantillonnage (effort, saison, espèce...) ainsi qu'un classement des sites en groupes d'induction.

3.6.2 Repères statistiques sur l'EROD

Dans un premier temps, compte-tenu de la transformation des données EROD, nous présentons les descripteurs de position et de variabilité de ce biomarqueur. Nous avons vu que la moyenne géométrique est un bon paramètre de dispersion des distributions log-normales de l'EROD. Elle est très bien corrélée à la médiane (Article 4). La moyenne arithmétique

surestime en général la position centrale de la distribution en raison des valeurs élevées des activités EROD de certains poissons (Figure 3-16).

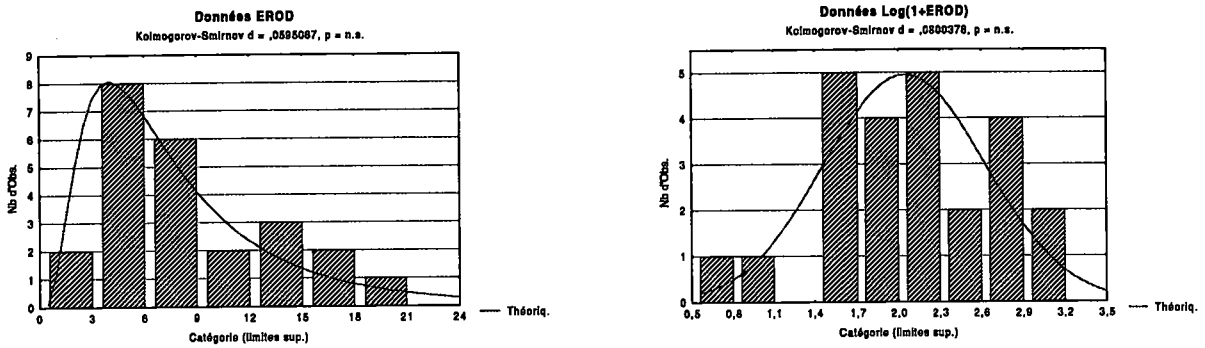


Figure 3-16. Normalisation de la distribution des activités EROD par la transformation logarithmique (données des chevaines mâles de l'automne en sites de référence).

D'après les relations entre la moyenne géométrique (g) et la moyenne arithmétique (m) (Tableau 3-9) on peut effectivement évaluer, avec σ de l'ordre de 0,7, un rapport théorique de 1,3 entre m et g.

Tableau 3-9. Paramétrisation des distributions.

	EROD	ERODt=Log(1+EROD)	Relations théoriques
Moyenne arithmétique	m	μ	$m=e^{(\mu+\sigma^2/2)}-1$
Moyenne géométrique	g		$g=e^{\mu}-1$
Médiane	med		med=g
Ecart-type	s	σ	
Variance	s^2	σ^2	$s^2= e^{(2\mu+\sigma^2)}(e^{\sigma^2}-1)$

L'écart-type σ quantifie la variabilité de la distribution des activités EROD[50]. Il dépend de l'espèce, du sexe, de la saison (article 4). Il est plus élevé chez les femelles maturantes et moins élevé en laboratoire que sur le terrain (en moyenne 0,45 pour des truitelles en laboratoire contre 0,70 pour les cyprinidés de terrain).

L'intérêt de prendre la moyenne géométrique est ainsi moins évident en conditions moins variables de laboratoire puisque, dans ce cas, la moyenne arithmétique est seulement supérieure de 10% à la moyenne géométrique.

Nous avons vu qu'une bonne distance statistique est l'écart en logarithme entre deux moyennes géométriques EROD. Or cela correspond au logarithme du taux d'induction entre

[50] D'ailleurs, on peut montrer qu'en première approximation σ est égal au coefficient de variation de la distribution des données EROD.

deux situations[51]. Le taux d'induction est utilisé depuis longtemps pour décrire des situations d'induction. Nous trouvons ici une cohérence statistique à cette utilisation.

3.6.3 Puissance de discrimination et classes de « qualité EROD »

La transformation logarithmique a pour conséquence de permettre des comparaisons de moyennes par tests paramétriques (test de Student). Statistiquement, il est aussi possible d'écrire les lois de probabilités associées aux risques de première et de seconde espèces en fonction des moyennes, écart-types, échantillonnage (Tomassone *et al.*, 1993). Nous allons voir que cela permet également de calculer l'effort d'échantillonnage nécessaire pour un écart détectable.

3.6.3.1 Puissance de test

La plupart des études écotoxicologiques n'étudient pas le risque de seconde espèce et ne testent que l'hypothèse nulle (H_0) (Tableau 3-10). Or les décisions environnementales devraient aussi reposer sur le risque de se tromper en acceptant l'hypothèse nulle (Johnson, 1988 ; Buhl-Mortensen, 1996 ; Hilborn, 1996). Autrement dit, pour un risque α de première espèce de 0,05, quel est le risque β de se tromper i.e. d'accepter l'égalité alors qu'elle est fausse (l'hypothèse alternative H_1 est vraie) ? (par exemple, classer « bien portant » un poisson malade).

Tableau 3-10. Les deux types d'erreur d'un test statistique (tiré de Tomassone et al., 1993).

Décision du test	Situation réelle inconnue	
	H_0 est vraie	H_1 est vraie
Accepter H_0	*Décision correcte*	*Risque deuxième espèce*
	Probabilité = 1 - α	Probabilité : β
Rejeter H_0	*Risque première espèce*	*Décision correcte*
	Probabilité : α	Probabilité = 1 - β

La puissance de test valant P=1-β, il s'agit d'augmenter P pour augmenter le pouvoir de discrimination du test (i.e. correctement rejeter l'hypothèse nulle). Certains auteurs considèrent qu'une puissance convenable est obtenue dès que P>0,8 (Buhl-Mortensen, 1996).

Ce pouvoir discriminant dépend étroitement de l'échantillonnage (nombre de poissons dans chacun des groupes que l'on compare), des écart-types de chacun des groupes ainsi que de la distance entre les moyennes.

[51] En effet, puisque moyennes arithmétique et géométrique sont proportionnelles, les taux d'induction calculés à partir de ces paramètres sont en moyenne égaux.

La puissance discriminante augmente avec l'effort d'échantillonnage : pour une erreur de seconde espèce inférieure ou égale à 0,05, on peut discriminer au risque de 0,05 deux groupes qui ont un écart de 1,8 (n=5) ; 1,2 (n=10) et 0,8 (n=20) (Figure 3-17).

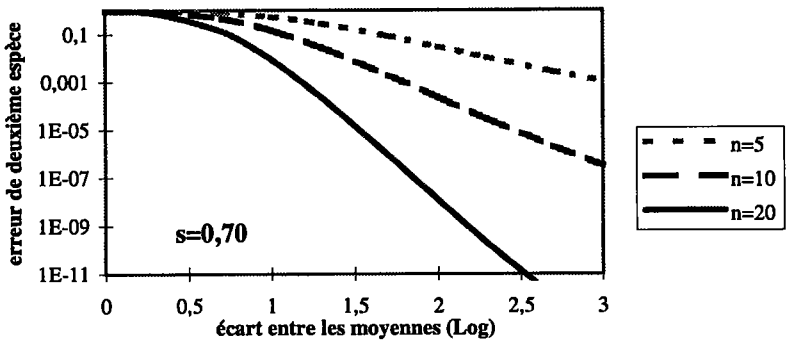


Figure 3-17. Erreur de deuxième espèce pour différents efforts d'échantillonnage pour s=0,70 (terrain)

D'autre part, la discrimination diminue avec la variabilité : les expériences de laboratoire (s=0,45) ont une plus grande puissance que les résultats de terrain (s=0,70) (Figure 3-18). Pour des groupes de 10 poissons, en laboratoire, un écart de 0,8 est détectable pour (α;β)=(0,05;0,05), contre un écart de 1,2 avec des poissons de terrain[52].

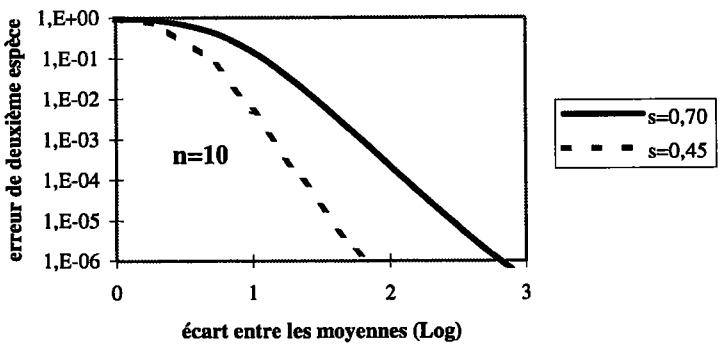


Figure 3-18. Comparaison des erreurs de deuxième espèce entre terrain (s=0,70) et laboratoire (s=0,45)

On pourrait ainsi décider du nombre de poissons à collecter en fonction d'une différence que l'on cherche à détecter. Par exemple, pour détecter un taux d'induction de deux[53], on constate (Figure 3-19) que les efforts d'échantillonnage pour obtenir un risque de deuxième espèce inférieur à 0,2 sont respectivement de la quinzaine de poissons sur le terrain et de la dizaine de poissons en laboratoire.

---

[52] Ce qui représente des taux d'induction respectifs de 2,2 et 3,3.

[53] Dans ce cas, la différence en Log est de 0,7.

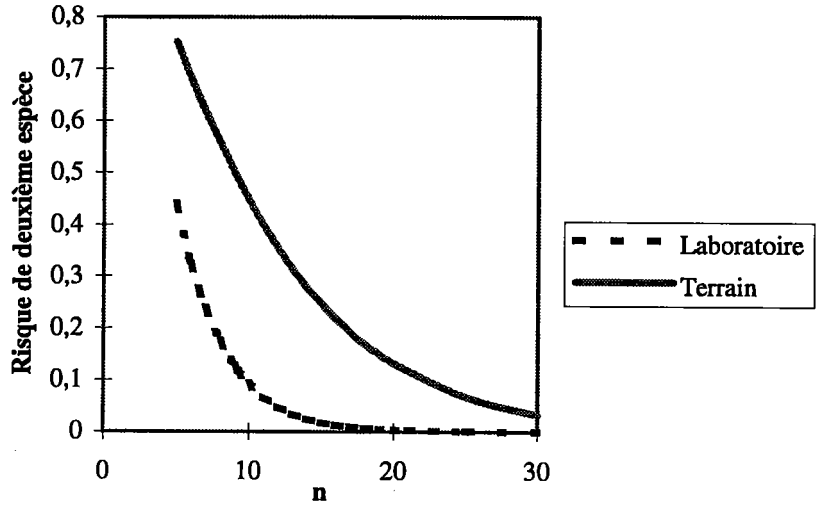


Figure 3-19. Risque de se tromper en fonction de l'échantillonnage (n) en acceptant l'égalité des moyennes (au risque d'erreur de 5%) alors qu'elles sont différentes d'un rapport 2.

Burgeot (1994) avait conclu sur des espèces marines à un échantillonnage conseillé de 6 à 10 poissons par site. Cependant, ses résultats étaient moins variables que les nôtres (CV de l'ordre de 30%).

3.6.3.2 Quelle borne supérieure de la classe de « référence EROD » accepter ?

Ces considérations de puissance de test permettent de fixer des classes d'induction de l'EROD en fonction de risques de première et de seconde espèces « acceptables ».

Pour le choix de la borne supérieure des valeurs de référence la prise en compte du risque de deuxième espèce est importante. En effet, ce risque β représente le risque pour l'environnement : accepter comme non-induites des situations qui le sont. Or toute diminution de α entraîne une augmentation de β. Donc, si on diminue α en choisissant un seuil plus élevé pour se prémunir de « faux positifs » (des situations non polluées mais avec une significativité <0,01) alors on risque d'accepter comme égales des situations qui ne le sont pas, donc obtenir des faux négatifs (des sites véritablement induits non différents des sites de référence).

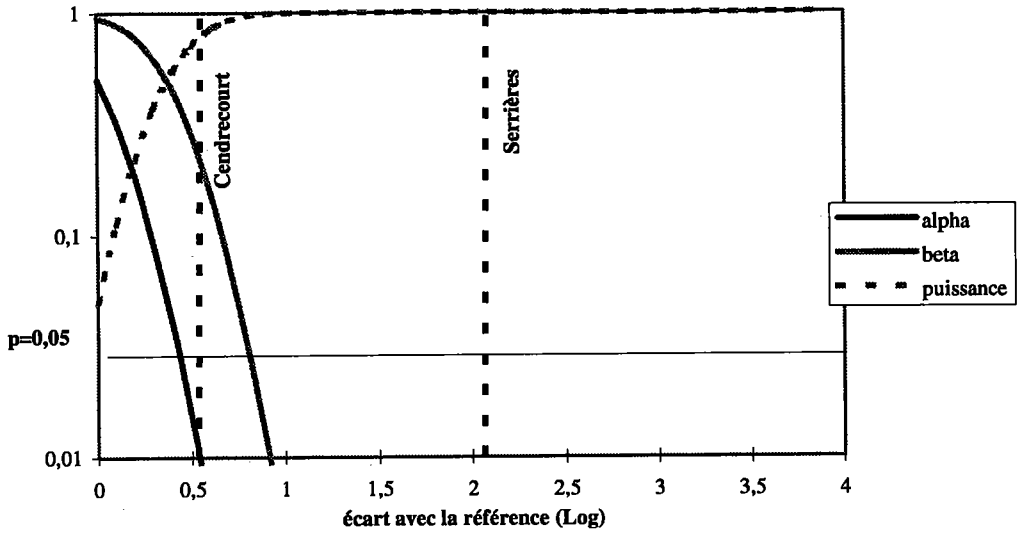


Figure 3-20. Prévision des erreurs de première et de seconde espèce (alpha=0,05) pour la comparaison d'un groupe de 10 poissons (avec s=0,6) par rapport aux chevaines mâles de référence en automne. Les barres en pointillés représentent les résultats pour les chevaines mâles d'automne 1995 à Cendrecourt et Serrières respectivement.

La Figure 3-20 illustre le décalage entre les risques de première et de seconde espèce dans le cas de la détection d'un écart par rapport à des valeurs de référence. En effet, pour un écart-type de 0,6 et un échantillonnage de 10 poissons, la différence entre ce groupe et les valeurs de référence pour les chevaines mâles en automne sera significative (p=0,05 ; test unilatéral) pour un écart de 0,4 (i.e. un taux d'induction de 1,5). Toutefois, le risque de se tromper à cet écart considéré vaut β=0,50. Pour diminuer ce risque pour l'environnement, et appliquer par là le principe de précaution, on peut être amené à augmenter le pouvoir de discrimination 1-β. La figure ci-dessous présente diverses courbes de puissance pour différentes valeurs de α.

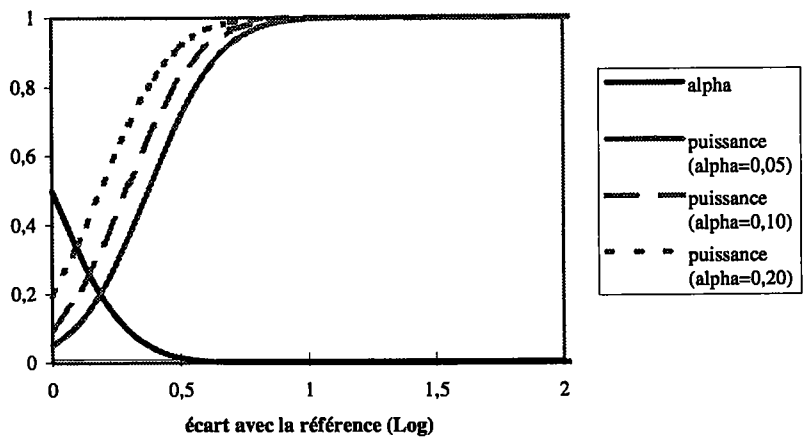


Figure 3-21. Lien entre le pouvoir de discrimination et le risque de première espèce (comparaison d'un groupe de 10 poissons d'écart-type 0,6 avec les valeurs de référence).

On observe alors qu'un pouvoir de discrimination convenable (P>0,8) est obtenu pour un écart de 0,4 si on choisit un seuil α de 0,2. Cette démarche de compromis, entre les risques de première et de deuxième espèces, sera appliquée pour les autres espèces, autres sexes et autres saisons dans le cas de la classe de référence.

3.6.4 Construction de classes d'induction de l'activité EROD

Nous proposons des classes pour les différents groupes de poissons (Tableau 3-11). Elles sont construites pour des groupes de 10 poissons selon les deux règles suivantes :

1. Pour la borne supérieure de la classe inférieure (de référence), le principe de précaution a été appliqué en retenant un risque de deuxième espèce inférieur à 0,2.
2. Quant aux classes supérieures d'induction, elles ont été déterminées en fonction de l'écart-type moyen (observé sur les sites) qui permet de calculer l'écart détectable au risque de première espèce de 0,05.

Le nombre de classes a été fixé à 5, rejoignant par là les recommandations européennes pour des indicateurs de qualité (Nixon *et al.*, 1996) :

Classe 1 : très bon état.
Classe 2 : bon état (richesse et viabilité malgré un effet significatif)[54].
Classe 3 : qualité médiocre.
Classe 4 : qualité mauvaise.
Classe 5 : qualité très mauvaise.

Nous avons donc retenu 5 classes pour les différents groupes de poissons (Tableau 3-11). Nous les présentons toutes même si la « confiance » qu'on peut accorder à leurs bornes dépend de la fiabilité des échantillonnages (en nombre de poissons et en nombre de sites) respectifs.

[54] Cette deuxième classe correspond aussi à l'objectif de restauration.

Tableau 3-11. Classes retenues comme significatives pour les espèces étudiées pour le classement d'un groupe de 10 poissons. Les données sont en Log(1+EROD) hormis celles de la dernière colonne qui sont en pmol/min/mg de protéines.

Espèce	Sexe	Saison	écart-type moyen[a]	Référence[b]	Borne sup de référence[c]	écart détectable[d]	classes EROD en Log[e]	classes EROD (pmol/min/mg protéines)
Barbeau	Femelle	Printemps	1,1	2,0	2,7	0,8	<2,7 ; 3,5 ; 4,3 ; >5,1	<13 ; 30 ; 70 ; >160
		Automne	0,7	2,5	2,9	0,5	<2,9 ; 3,4 ; 3,9 ; >4,4	<17 ; 28 ; 47 ; >80
	Mâle	Printemps	1,0	2,2	2,7	0,8	<2,7 ; 3,5 ; 4,3 ; >5,1	<13 ; 30 ; 70 ; >160
		Automne	0,8	1,5	2,0	0,6	<2,0 ; 2,6 ; 3,2 ; >3,8	<6 ; 11 ; 20 ; >40
	Juvénile	Printemps	0,7	1,6	2,3	0,6	<2,3 ; 2,9 ; 3,5 ; >4,1	<9 ; 17 ; 30 ; >55
		Automne	0,7	1,2	1,7	0,5	<1,7 ; 2,2 ; 2,7 ; >3,2	<5 ; 8 ; 13 ; >23
Chevaine	Femelle	Printemps	1,0	1,5	1,9	0,7	<1,9 ; 2,6 ; 3,3 ; >4,0	<6 ; 12 ; 25 ; >50
		Automne	0,7	1,2	1,7	0,6	<1,7 ; 2,3 : 2,9 ; >3,5	<5 ; 9 : 17 ; >30
	Mâle	Printemps	0,8	2,2	2,6	0,6	<2,6 ; 3,2 ; 3,8 ; >4,4	<12 ; 22 ; 40 ; >72
		Automne	0,6	2,1	2,5	0,5	<2,5 ; 3,0 ; 3,5 ; >4,0	<11 ; 18 ; 30 ; >55
	Juvénile	Printemps	0,9	2,7	3,3	0,7	<3,3 ; 4,0 ; 4,7 ; >5,4	<25 ; 50 ; 100 ; >200
		Automne	0,7	2,2	2,7	0,5	<2,7 ; 3,2 ; 3,7 ; >4,2	<13 ; 21 ; 35 ; >60
Goujon	Femelle	Printemps	0,9	2,0	2,6	0,7	<2,6 ; 3,3 ; 4,0 ; >4,7	<12 ; 25 ; 50 ; >100
		Automne	0,5	3,0	3,4	0,4	<3,4 ; 3,8 ; 4,2 ; >4,6	<29 ; 43 ; 66 ; >100
	Mâle	Printemps	0,9	3,3	3,6	0,6	<3,6 ; 4,2 ; 4,8 ; >5,4	<35 ; 64 ; 120 ; >220
		Automne	0,5	2,8	3,2	0,4	<3,2 ; 3,6 ; 4,0 ; >4,4	<23 ; 35 ; 52 ; >78

[a]Ecart-types moyens des distributions Log-transformées pour les stations du Rhône et de la Saône (1995-1996). Il est calculé comme la racine carrée de la moyenne des variances observées pour chaque station.

[b]Valeur moyenne de référence selon le Tableau 3-1.

[c]Calculé à partir de la colonne référence moyenne et en tenant compte de l'écart-type moyen pour un risque de seconde espèce de 0,20.

[d]Calculé à partir de l'écart-type moyen pour un risque de première espèce de 0,05.

[e]Calculé à partir de la borne sup de référence pour la première classe puis avec l'écart détectable pour les autres classes.

Ces classes ont été appliquées aux résultats de 1995 et de 1996 pour les sites de Cendrecourt, Vernaison et Serrières (Tableau 3-12). On peut ainsi classer les sites pour chaque espèce et chaque sexe. Les résultats ne sont d'ailleurs pas systématiquement cohérents d'un sexe à l'autre ou d'une espèce à l'autre. Toutefois, les classes « moyennes » pour Cendrecourt, Vernaison et Serrières peuvent être estimées à 1-2 ; 3 et 4 respectivement.

Tableau 3-12. Classement de sites selon les classes du Tableau 3-11.

Espèce	Sexe	Cendrecourt		Vernaison				Serrières			
		p95	a95	p95	a95	p96	a96	p95	a95	p96	a96
Chevaine	Femelle	1	2	3	4	2	3	3	5	3	4
	Mâle	1	2	3	3	3	2	5	4	5	4
	Juvénile	2	2	1	4	2	3	3	5	4	4
Goujon	Femelle	1	1	1	4	3	3	1	5	3	3
	Mâle	1	2	-	-	3	2	1	-	4	4

p : printemps ; a : automne.

3.6.5 Discussion

On peut s'interroger sur l'origine de la distribution des activités EROD. La lognormalité des données EROD pourrait être la conséquence d'un phénomène de dilution, ou d'un phénomène où beaucoup de variables intermédiaires sont impliquées (Ott, 1995), ou la conséquence d'un processus biochimique (de type cinétique enzymatique). Dans ce deuxième cas, une transformation log-logistique aurait peut-être été plus appropriée mais on montre que numériquement ces deux types de distribution sont quasi semblables (Roman, 1996). Il aurait aussi été possible de déterminer quelle transformation est susceptible de fournir la meilleure normalité pour les données EROD. Dans cette perspective, la famille de transformation de Box et Cox serait appropriée (Tomassone *et al.*, 1993). Dans le cadre de notre étude, la transformation logarithmique des données a donné des résultats convenables et présente par ailleurs l'avantage de permettre un retour simple aux données originelles (par la moyenne géométrique).

La méthode corrective pour les femelles (connaissant le RGS) pourrait permettre de réduire l'effort d'échantillonnage[55] ou d'augmenter la puissance de test en regroupant les deux sexes (n=20).

Différentes optiques peuvent être considérées pour l'établissement de « classes de qualité EROD » : statistique (pouvoir discriminant), biologique (quel taux d'induction a du sens quant à un effet irréversible probable), chimique (quel est l'écart EROD associé à une augmentation significative de l'exposition aux inducteurs...PCB musculaires et HAP biliaires). Seul le premier scénario a été étudié en détail compte-tenu de nos données (Tableau

[55] Ne prélever que 10 adultes tous sexes confondus.

3-11). Les classes ne sont pas homogènes entre espèces, sexes et saisons, car les variabilités dépendent de ces facteurs.

En ce qui concerne la deuxième optique, on peut se référer aux études faisant le lien avec des variables biologiques plus « intégrées » que l'EROD. Par exemple, Masfaraud (1992) a étudié la relation entre l'activité EROD et l'activation métabolique du BaP (quantifiée par le nombre d'adduits à l'ADN) chez la truite arc-en-ciel. *In vitro*, la corrélation est significative (R=0,8) et un taux d'induction de 2 est cohérent avec un nombre d'adduits significativement supérieur à celui des témoins. *In vivo*, la corrélation est aussi significative avec de même une co-occurence d'une induction de l'activité EROD d'un facteur 1,7 et une quantité d'adduits significative. On pourrait ainsi décider qu'un taux d'induction a du sens dès qu'il est supérieur à 2 et donc appliquer un écart de 0,7 (=Log(2)) entre les classes quels que soient l'espèce, le sexe ou la saison.

Enfin, une étude bibliographique approfondie pourrait recenser les concentrations chimiques à l'origine d'inductions significatives de l'EROD. On se heurterait alors à la difficulté suivante : rares sont les situations de terrain où une seule famille chimique est responsable de l'induction. Avec nos données, on peut toutefois rapprocher dans un même tableau les classes d'induction de l'EROD avec les concentrations observées de contaminants dans les muscles et les sédiments (Tableau 3-13).

Tableau 3-13. Comparaison pour des sites du bassin du Rhône des classes EROD du chevaine avec les concentrations en PCB et HAP et avec les classes d'IBGN et d'IOBS.

Classe EROD	Site	PCB^{a}_{m}	PCB^{b}_{sed}	PCB^{b}_{mes}	HAP^{b}_{sed}	HAP^{b}_{mes}	IBGN[c]	IOBS[d]
1	Drôme	<0,2	0	NM	0	NM	1	NM
1	Ain	<0,6	0	NM	1,3	NM	2	2-3
1	Ardèche	<0,3	0	NM	0	NM	2	NM
1-2	Cendrecourt	0,3-0,8	0	NM	0,9	1,6	3	2
2	Trévoux	1,3-5,2	NM	0,02	NM	0,5	3	NM
3	Vernaison	0,7-1,9	0,04	0	1,0	0	NM	NM
3	Jons	0,8-2,0	0	0	0,6	1,0	2	3
3	Collonges	2,0-9,4	0	0	1,3	1,6	3	2
4-5	Serrières	1,0-13,3	0,14	0,42	1,0	0,2	NM	NM
5	Givors	1,4-5,1	0,93	0,06	1,7	0,7	3	4

[a]Concentration dans le muscle de chevaine du congénère PCB153 en µg/g de matière grasse.
[b]Concentration en mg/kg de poids sec.
[c]Classes utilisées par l'Agence de l'Eau RMC et renommées selon : (1A,1B,2,3,Hors Classe)→(1,2,3,4,5).
[d]Classes de l'indice oligochète selon Lafont (1989).
NM : non mesuré.

3.6.6 Conclusion

L'établissement de classes de qualité, quoique fondé sur un argumentaire, garde toujours une part d'arbitraire. C'est l'utilisation des classes qui valide la pertinence de leurs bornes à décrire la qualité du milieu.

Pour simplifier l'utilisation de ces classes, on peut facilement transformer les bornes logarithmiques en valeurs EROD. On pourrait également étudier la possibilité de regrouper certaines classes (par exemple les deux saisons des chevaines adultes).

Les critères numériques sont utiles mais risquent malheureusement d'être une fin en soi alors qu'ils ne devraient être qu'un moyen : à chaque classe devrait être associée une recommandation de gestion (Chapman, 1991). D'autre part, la mise en place de classes de qualité donne un résultat chiffré dont il faut relativiser l'importance. En réalité, et ceci est d'autant plus vrai que l'on se situe aux bornes des classes, rien n'est tout blanc ni tout noir mais plutôt « gris » (Chapman, 1991) et c'est l'interprétation fine qui compte davantage que la note attribuée.

4. DISCUSSION GÉNÉRALE

Nous discutons dans cette partie notre méthodologie de recherche et proposons des pistes de recherche ultérieures et des recommandations pour une utilisation de l'induction du cytochrome P450 1A en suivi environnemental.

4.1 Méthodologie

4.1.1 Terrain et laboratoire

La validité et la généralité de nos résultats dépendent très fortement du choix des sites et de l'éventail des paramètres chimiques et biologiques les caractérisant. Avec Jons, Vernaison et Serrières, on dispose d'un gradient de contamination sur le Rhône ; avec Cendrecourt, Trévoux-Collonges, un gradient sur la Saône avec des pollutions de natures différentes. La collecte d'informations sur d'autres rivières importantes (Moselle, Seine, Loire...) compléterait l'analyse, d'autant plus qu'il faudrait vérifier la validité des valeurs de référence dans d'autres bassins. Les éventuelles différences entre poissons d'une même espèce mais originaires de sites « éloignés » pourraient alors être étudiées par l'examen du polymorphisme enzymatique (Bouvet *et al.*, 1992) qui permet de quantifier à la fois la variabilité intra-population et la différence inter-populations. Par exemple, la variabilité génétique du gardon dans le Haut-Rhône est expliquée à 90% par la variabilité intra-population (Bouvet *et al.*, 1991). Par ailleurs, il a été observé une différenciation génétique entre Rhône amont (de Lyon) et Rhône aval qui pourrait être due aux aménagements hydroélectriques sur le Rhône (Bouvet *et al.*, 1991, 1992 ; Carrel *et al.*, 1995).

Une critique classique quant au prélèvement de poissons *in situ* est l'incertitude due à l'éventuelle mobilité des poissons. Par exemple, si le barbeau semble présenter un degré de stabilité élevé 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). Le goujon est également une espèce sédentaire. En revanche, le chevaine, pélagique, est peut-être davantage mobile. A ce titre, l'utilisation d'invertébrés est une piste intéressante pour l'avenir même si, à l'heure actuelle, l'étude des monooxygénases chez les invertébrés n'est pas aussi avancée que chez les poissons (Stegeman et Hahn, 1994).

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). Pour tenter de pallier cette difficulté, on peut utiliser des poissons d'élevage placés

dans des cages (Fenet *et al.*, 1996) ou dans des bassins expérimentaux de dérivation[56] *in situ* (Kosmala *et al.*, sous presse). Ces techniques permettent d'utiliser une espèce qui ne présente pas les phénomènes d'adaptation à la pollution ambiante que peuvent présenter les espèces locales. En contrepartie, il faut veiller à maintenir une densité convenable afin de réduire le stress et l'augmentation de cortisol susceptible de moduler l'activité EROD (Devaux *et al.*, 1992).

D'autre part, la pêche et la capture du poisson engendrent un stress important. Si en outre le poisson est transporté vivant au laboratoire, il peut souffrir d'anoxie et de stress qui est susceptible d'avoir des effets néfastes (Santos et Pacheco, 1996). L'acclimatation au laboratoire de poissons ramenés de pisciculture ou du terrain est donc déterminante tant l'induction de l'activité EROD peut être modifiée par cette opération de transfert (Huuskonen *et al.*, 1995). Toutefois, en ce qui concerne les poissons de l'Ain et de Serrières ramenés au laboratoire, nous n'avons observé aucune différence significative entre l'activité EROD mesurée sur le terrain avec celles mesurées le lendemain au laboratoire ou 3 jours plus tard.

4.1.2 Descripteurs biologiques

Les trois espèces retenues ont pu être échantillonnées sur tous les sites hormis le barbeau. Le chevaine est reconnu comme une espèce présente en abondance sur l'ensemble du territoire français tout en présentant un très faible intérêt pour les pêcheurs. Cette espèce est donc un bon candidat pour l'obtention de variables biologiques en routine. Il est intéressant de compléter l'information donnée par ce poisson de pleine eau en prélevant aussi du goujon, poisson qui présente le double intérêt d'être benthique et d'avoir une taille compatible avec les expérimentations de laboratoire.

Les paramètres physiologiques sont intéressants. Si le facteur de condition dérive directement des mesures de taille et de poids, le RHS demande, quant à lui, un temps de dissection non négligeable chez les cyprinidés et son intérêt demande donc à être validé. Quitte à disséquer l'ensemble du foie, une valeur ajoutée pourrait être obtenue en faisant de l'histopathologie qui présente l'intérêt de donner des indications sur l'état de santé de l'organisme tout en étant plus sensible que des paramètres de reproduction ou de croissance (Teh *et al.*, 1997).

Grâce à l'étude du RHP, à l'occasion de laquelle un bilan sanitaire a été réalisé sur les chevaines, des liens éventuels entre l'induction de l'activité EROD, un indice parasitaire et un marqueur d'immunotoxicité ont été mis en évidence (Morand, 1997). Ce type de relation est intéressant et devrait être validé en menant à la fois des études contrôlées de laboratoire et des études de suivi sur le terrain.

---

[56] Alimentés par l'effluent en continu.

4.1.3 Descripteurs chimiques

La variabilité des concentrations en PCB dans les muscles de chevaines pour les sites de Rhône 1 et Rhône 2 est importante. Pourtant, les PCB sont réputés stables dans les muscles de poissons (Tableau 4-1).

Tableau 4-1. Temps de demi-vie (en mois) chez les poissons de PCB bioaccumulés pour des inducteurs (congénères 77, 126 et 169) et un non-inducteur (congénère 153).

	PCB77	PCB126	PCB169	PCB153	Références
Truite	2,1	>2 ans	>2 ans	>2 ans	Niimi et Oliver, 1983
	1,6	7	3,6	2,9	Coristine *et al.*, 1996
Guppy	2,2[a]	6,6[a]	20,4[a]	8,4	Bruggeman *et al.*, 1984

[a]Modélisé d'après les résultats de Clark *et al.* (1990).

Ainsi, puisque nos résultats de concentration en PCB 153 montrent des écarts importants d'une campagne à l'autre (facteur 10 pour le site de Rhône 2) malgré la persistance de ce congénère, la stabilité de l'échantillonnage d'une campagne de pêche à l'autre pourrait être remise en question (quantité de matière grasse, âge des poissons...).

Si globalement les espèces les plus riches en matière grasse ont effectivement des concentrations en PCB supérieures à celles des espèces les moins grasses, il reste qu'en considérant chaque poisson au sein d'une même espèce les corrélations sont moins claires (Stow *et al.*, 1997) avec des effets dus à la période de reproduction et à l'âge (Madenjian *et al.*, 1995).

Par exemple, chez le chevaine il a été observé (Habashy, 1974) que le contenu musculaire en matière grasse peut diminuer d'un facteur 2 chez les mâles comme chez les femelles entre le début et la fin de la période de reproduction.

Enfin, la taille (âge) du poisson influence les cinétiques de bioaccumulation et d'élimination (ainsi une taille multipliée par 10 entraîne un taux d'élimination divisé par 3) (Sijm et Van der Linde, 1995). Mais d'après Van der Oost *et al.* (1997), l'effet taille serait minimisé grâce à la normalisation lipidique des concentrations, ce qui confirme les conclusions de Devaux et Monod (1987) et de Chevreuil *et al.* (1995).

Les HAP n'ont quant à eux pas été détectés dans les muscles. Sachant que les métabolites issus des HAP sont concentrés dans la bile avant d'être éliminés, les mesures des concentrations biliaires en HAP auraient été appropriées, car elles donnent de bonnes corrélations avec l'exposition en HAP et sont donc conseillées (Varanasi et Gmur, 1981 ; Collier et Varanasi, 1994 ; Beyer *et al.*, 1996 ; Fenet, 1997).

4.2 Perspectives

Mayer *et al.* (1992) ont rappelé les critères pour le choix d'un biomarqueur destiné à une utilisation sur le terrain :

1. Mesure simple et économique.
2. Réponse dépendant simplement de la dose et du temps et qui permette une quantification de l'exposition ou de l'effet à partir de la mesure du biomarqueur.
3. Bonne sensibilité.
4. Variabilité aux facteurs non toxiques (organisme, environnement, méthode) qui soit bien comprise et dans des limites acceptables.
5. Signification biologique (i.e. un impact biologique ou sociologique sur la taille ou la condition de la population).

Ce travail a complété les connaissances sur l'interprétation des niveaux d'activité EROD. Même si la totalité de ces conditions n'est pas indispensable (Mayer *et al.*, 1992), on peut s'interroger sur la pertinence écologique de ce biomarqueur. Sans entrer en profondeur dans ce débat classique, nous aimerions en dire quelques mots. Enfin, nous tenterons de concrétiser nos résultats dans un souci de proposer un outil de surveillance des écosystèmes aquatiques.

4.2.1 Pertinence écologique ...?

Les réponses biologiques et écologiques à la présence de polluants sont des effets qui vont du niveau moléculaire (ADN, protéines...) au niveau des populations et des communautés (dynamique, chaînes alimentaires). Les approches au niveau de l'organisme ont des avantages comme des inconvénients tout comme les études de population (Attrill et Depledge, 1997). Ainsi, il est par nature impossible d'obtenir une bonne sensibilité et une bonne représentativité écologique ! (Figure 4-1).

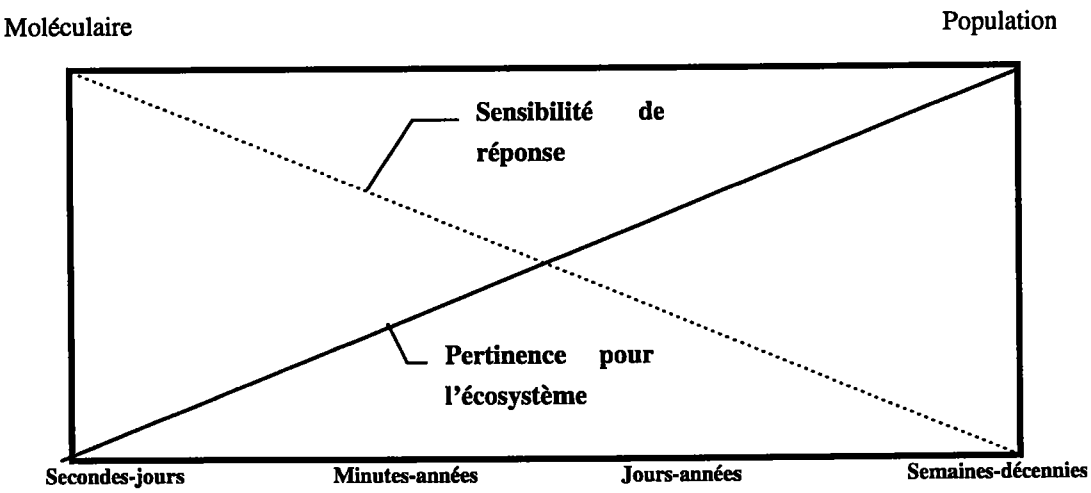


Figure 4-1. Relation temps-sensibilité-écosystème (d'après Schlenk et al., 1996).

Une étude récente a rassemblé sur le poisson des mesures de biomarqueurs biochimiques, de l'état de santé (FC, indice poisson...) et de population (Schlenk *et al.*, 1996). Il en ressort que si des corrélations existent au niveau de l'individu, les liens entre des paramètres individuels et des paramètres populationnels sont moins évidents. Cela confirme les études réalisées sur l'impact des effluents de papeterie (Kloepper-Sams *et al.*, 1994 ; tableau 5 de l'article 1).

Rappelons à ce sujet l'importance des facteurs servant à juger de la crédibilité d'une association causale (intensité de la réaction, constance, spécificité, plausibilité temporelle « cause puis effet », relation dose/réponse, cohérence avec les autres observations, élimination de la cause hypothétique, analogie avec d'autres cas connus)(d'après Suter, 1993). De nombreuses études ont ainsi montré des liens statistiques entre des effets sur des individus et des effets sur les populations mais cela doit être validé par des études sérieuses de cause à effet (Shindler, 1987).

Cette discussion est ancienne (Payne, 1984) et traduit la difficulté à lier des paramètres par nature éloignés (Figure 4-1). D'autre part, la réponse des paramètres populationnels a lieu lorsque l'impact est grand. Or, pour de très fortes contaminations, les biomarqueurs biochimiques ont des réponses faibles (faux négatifs) (Figure 4-2). Cette non-linéarité de réponse entre indicateurs précoces et indicateurs intégrateurs ne peut que compliquer cette problématique.

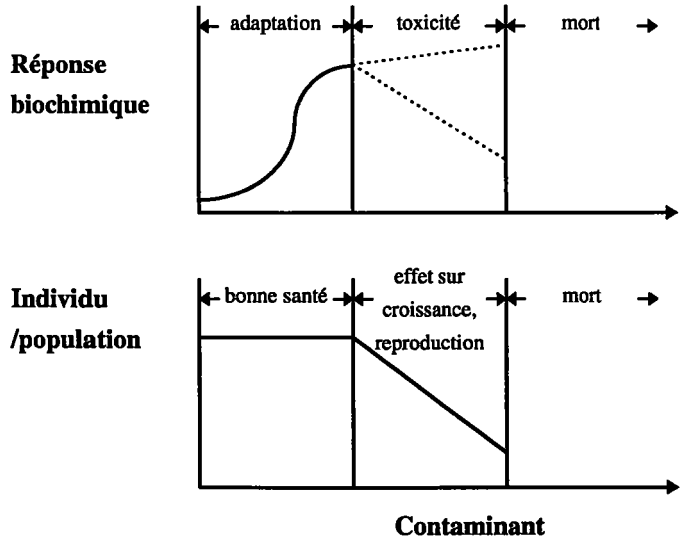


Figure 4-2. Difficulté pour distinguer entre toxicité et réponse d'adaptation (tiré de Mayer et al., 1992).

Nous avons vu que les goujons de Serrières présentent des inductions de l'activité EROD vraisemblablement très élevées (proches d'un maximum). On peut alors penser que déjà des effets irréversibles se produisent. Pour s'en persuader il s'agirait de seconder la mesure de l'EROD avec un marqueur non spécifique d'effet toxique afin de conclure sur la phase adaptation ou toxicité. Par exemple, pour détecter des faux négatifs dus à une atteinte hépatique (hépatotoxicité), les transaminases sériques peuvent être dosées (Van Veld *et al.*, 1992 ; Mayer *et al.*, 1992). Toutefois, après une exposition durant 14 jours à des sédiments très contaminés en HAP, des anguilles en cage ont présenté des inductions de l'activité EROD significatives mais aucune modification des concentrations en transaminases sériques (Fenet, 1997). La mesure de la phosphatase alcaline dans l'intestin des poissons a également été proposée comme indicateur d'inhibition par les métaux (Aluminium, Zinc, Mercure, Cadmium) (Bogé *et al.*, 1988). Mais cette mesure présente l'inconvénient d'être influencée par les ions magnésium, chlorure et potassium (Utida *et al.*, 1968 ; Bogé *et al.*, 1983).

Une autre voie de recherche intéressante pour l'étude de la liaison entre la mesure de ce biomarqueur et la détection d'effets biologiques à un niveau supérieur est l'examen des interactions potentielles entre des effets sur la reproduction (impact sur la vitellogénèse) et l'induction du cytochrome P450 1A (en particulier les substances oestrogéniques).

4.2.2 ...ou sonde chimique ?

Si la mesure de l'induction de l'activité EROD n'est qu'un indicateur chimique on peut alors douter de son intérêt par rapport à des dosages chimiques ou immunoenzymatiques (Rodolico *et al.*, 1997). L'avantage de la mesure de l'activité EROD sur l'analyse chimique est qu'elle traduit une exposition de la biologie à des polluants biodisponibles. La pertinence de la mesure de ce biomarqueur est donc dans un premier temps de quantifier la biodisponibilité des inducteurs pour les poissons.

Cependant, déduire de la réponse biologique (soumise à des facteurs naturels de variabilité) les concentrations d'exposition des polluants (qui varient dans le temps) est délicat, sauf si un de ces polluants responsables de la réponse a un effet prépondérant par rapport aux autres. L'interprétation nécessite donc la confrontation de paramètres chimiques et de paramètres biologiques (dont l'EROD), par exemple sur plusieurs points le long d'une rivière, dont la comparaison des gradients respectifs peut éventuellement indiquer une causalité (Adams *et al.*, 1996).

Enfin, une dernière possibilité est d'appliquer le principe de précaution et d'estimer alors, qu'en l'absence de preuves contraires certaines, toute détection d'une induction de l'activité EROD est le signe d'un risque non nul pour l'organisme et que de ce fait elle est inacceptable (Lopez-Barea, 1994).

4.2.3 Stratégie pratique

Echantillonnage

Une première option serait de considérer les plages de stabilité de l'induction pour les différents facteurs de variabilité et donc d'échantillonner dans ces plages. Par exemple : 10 chevaines adultes de 25 cm en automne quand la température est de 15°C...c'est l'application du principe de précaution à une variable biologique[57] (Munkittrick et Dixon, 1989). Concrètement, il n'est pas facile d'avoir des échantillons à ce point homogènes surtout si les sites sont nombreux.

Une deuxième stratégie est alors d'utiliser des formules correctives validées pour mettre les différents échantillonnages sur le même plan : correction des femelles par le RGS, correction de taille...Il est alors bien évident que ces relations doivent être valables dans tous les cas où elles seraient utilisées.

L'échelle temps compatible avec un suivi de l'EROD est de 1 mois (décroissance de l'induction pour des polluants de type hydrocarbure) et l'échelle espace est de 1-2 km compatible avec les déplacements du chevaine. On peut en déduire le réseau et la fréquence correspondants. Un rapide calcul montre que cela reviendrait très cher à la collectivité. Il est donc possible de différencier les points à risque (effluents à étudier spécifiquement[58]), des points de suivi qualité (type RNB). Dans le deuxième cas, un échantillonnage annuel serait suffisant[59].

De l'intérêt d'un réseau...

Un résultat sur un seul site ne suffit pas à donner un diagnostic ! Hormis si l'on a des références pour le comparer : soit géographiquement (par rapport à la Drôme ou par rapport à l'amont), soit temporellement (par rapport à une mesure réalisée auparavant sur le même site). Le maximum d'information est donc réalisé dans le cadre d'un réseau avec une typologie de sites mesurés avec une fréquence compatible avec la variable biologique utilisée. Un réseau doit donc avoir une bonne couverture spatiale ainsi qu'une pérennité ; et cela tant pour donner une information sur l'évolution au gestionnaire (signe de bonne gestion ou d'une dégradation) que pour permettre au scientifique de mieux comprendre le fonctionnement. La prise en compte de l'échelle temps couplée à l'échelle géographique consiste à compléter l'état des lieux avec sa tendance évolutive.

---

[57] Pour fixer les idées, une augmentation du RGS des chevaines femelles d'un rapport 2 entraîne une baisse de l'EROD de 25% en site de référence et de 50% pour le site de Serrières.

[58] Dans ce cas, l'utilisation de poissons mis en cage ou en bassin de dérivation de l'effluent serait préférable à une pêche.

[59] En évitant si possible l'hiver et la période de reproduction (migration et variabilité de l'induction).

A ce titre l'expérience du RHP s'est révélée féconde. Conçu au départ pour établir un état annuel des peuplements piscicoles, ce réseau pourrait servir de base à des collaborations multi partenariales (Porcher, 1997). Le prélèvement de poisson étant réalisé, d'autres mesures sur ces mêmes poissons sont de fait moins coûteuses.

Approche multi-biomarqueurs

Un diagnostic complet ne peut reposer sur une seule variable biologique, car l'effet biologique n'est pas en général spécifique d'un seul contaminant (Figure 4-3).

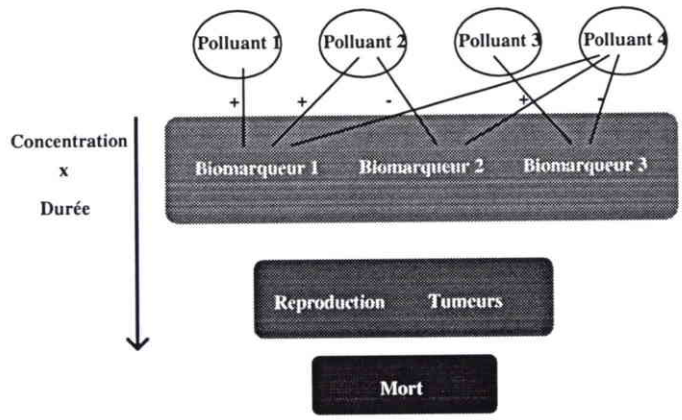


Figure 4-3. Intégration successive de l'information de l'exposition chimique à la mort.

Les informations données par différents biomarqueurs sont ainsi complémentaires. Par exemple, nous avons montré l'intérêt de la détection de l'activité acétylcholinestérasique (articles 6 et 7) conjointement à la mesure de l'EROD. Diverses études ont utilisé une batterie de biomarqueurs (Beyer *et al.*, 1996 ; Van der Oost *et al.*, 1996 a et b) donnant chacun l'information correspondant à sa spécificité. Notons que l'EROD est en général mieux corrélée que les autres avec les descripteurs chimiques (voir par exemple, Van der Oost *et al.* (1997) avec une analyse statistique multivariée sur 21 biomarqueurs).

Il est inutile dans tous les cas d'utiliser tous les biomarqueurs disponibles. Une étude de risque pour l'environnement doit déterminer le niveau d'organisation adéquat (le maillon faible car sensible). Sur les variables biologiques retenues, une méthode de prévision robuste doit être appliquée (Attrill et Depledge, 1997).

Ainsi, pour l'EROD comme pour chacune des variables biologiques susceptibles d'apporter une information sur la qualité des milieux aquatiques, une attention particulière doit être portée sur le choix des conditions de référence[60] car ce choix détermine la détection

[60] La définition des conditions de référence est un point clef de l'approche harmonisée européenne de la qualité des eaux de surface.

et la quantification d'un impact (Nixon *et al.*, 1996). Trois types de méthodes sont imaginables (Nixon *et al.*, 1996) :

1. Classement de sites naturels (par exemple la méthode des pentes de Huet, 1949).
2. Modèle prédictif tel RIVPACS[61] qui repose sur des descriptions de populations d'invertébrés benthiques pour lesquels des données sont disponibles pour environ 700 sites non perturbés de Grande Bretagne. L'entrée d'un nouveau site avec les résultats sur les invertébrés et les descripteurs physico-chimiques permet de le situer par rapport à ces 700 sites.
3. Référence temporelle, pour un même site, ce qui minimise le problème de l'extrapolation inter-site mais pose la question de l'existence de données anciennes et de leur validité.

Pour la quantification d'un impact le problème se réduit à la définition d'une référence acceptable pour laquelle on estime qu'il n'y a pas d'altération anthropique. A partir de là, dans un espace à n dimension, on peut toujours calculer une distance (ou une probabilité) aux références des variables descriptives (Kersting, 1988 ; Munkittrick et Dixon, 1989 ; Suter, 1990)[62].

Etapes de validation d'un biomarqueur

Mac Carthy (1990) définit cinq étapes pour un programme de validation complète d'un biomarqueur :

1. Collecte de données en sites de référence et en sites pollués (avec la prédominance d'un seul polluant) pour évaluer la capacité du biomarqueur à distinguer les situations polluées des situations non polluées.
2. Expériences de laboratoire sur des espèces sentinelles pour quantifier les effets d'une exposition (mélange de polluants, effets long-terme...). Liens avec d'autres biomarqueurs.
3. Collecte de données sur des sites avec des situations complexes de pollution en utilisant plusieurs biomarqueurs.
4. Etude du pouvoir prédictif des biomarqueurs quant à des effets à des niveaux biologiques supérieurs (reproduction...).
5. Prédiction des risques pour l'homme.

---

[61] River InVertebrate Prediction And Classification System.

[62] Certains auteurs critiquent les utilisations d'indices agrégés qui sont la moyenne de n composantes (par exemple 12 pour l'Index of Biotic Integrity américain) et peuvent donc éclipser les composantes anormalement faibles ou fortes (Suter, 1993). Avec les techniques d'analyses multivariées il est pourtant possible de garder la totalité des composantes.

Les résultats de ce travail montrent que, pour le biomarqueur étudié ici, les deux premières phases sont bien avancées. L'implication dans le Programme National d'EcoTOXicologie (PNETOX) va permettre l'utilisation conjointe de plusieurs biomarqueurs et bioindicateurs sur des sites communs présentant des pollutions complexes. La troisième étape sera ainsi bien avancée. Des connaissances fondamentales seront encore nécessaires pour remplir les objectifs des phases 4 et 5.

5. CONCLUSION GÉNÉRALE

Le but de ce travail était de réunir autour d'espèces communes de cyprinidés un ensemble de résultats permettant d'asseoir la connaissance et l'utilisation du biomarqueur induction du cytochrome P450 1A.

Dans cette optique, il s'agissait de quantifier, en sites pollués ou non, les influences respectives sur l'induction de l'EROD des facteurs naturels (maturité sexuelle) et chimiques (inducteurs) afin de faire la part de l'exposition des poissons à la pollution.

Par ailleurs, il était utile de vérifier en laboratoire les influences de ces facteurs et de prendre en considération d'une part l'histoire de l'exposition du poisson et d'autre part les phénomènes d'inhibition catalytique grâce à la détection immunochimique.

Enfin, il s'agissait de synthétiser l'ensemble des résultats et de proposer une interprétation pertinente en situant les résultats les uns par rapport aux autres.

5.1 Synthèse des résultats

Pour l'utilisation *in situ* de la mesure de l'induction de l'activité EROD on dispose désormais de valeurs en sites peu pollués susceptibles de servir de valeurs de contrôle pour interpréter des données en sites contaminés (article 3). Ces valeurs « témoins », pour être élevées au statut de « valeurs de référence », devront être confirmées sur d'autres sites et d'autres bassins pendant plusieurs années afin d'obtenir une base solide de référence. La faisabilité d'une telle approche a été montrée grâce à nos résultats sur quelques espèces et quelques sites.

Les deux facteurs de variabilité prépondérants (inducteurs et sexe) ont été quantifiés à la fois sur le terrain (article 4) et en laboratoire (article 5). L'interprétation des valeurs mesurées sur le terrain est donc facilitée. L'induction de l'activité EROD a ainsi pu être reliée aux PCB bioaccumulés, ce qui est cohérent avec le statut inducteur pour certains d'entre eux, cependant, dans d'autres situations de terrain, il a été possible de corréler l'induction avec d'autres descripteurs chimiques (HAP...). 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.

L'étude de la sensibilité de la mesure a été abordée en laboratoire et sur le terrain pour estimer la possibilité qu'a ce biomarqueur à répondre à une nouvelle "pollution" ainsi que sa réversibilité éventuelle lorsque la "pollution" a diminué (article 5).

L'étude des cas d'interaction et d'inhibition (réalité des situations de terrain) a confirmé, dans le cas de l'inhibition catalytique par un organophosphoré, l'intérêt de

l'utilisation complémentaire de la détection immunochimique (article 7). Dans les autres cas testés (terrain et laboratoire), la mesure immunochimique a confirmé, qualitativement, la mesure de l'activité EROD. Comme le croisement de l'anticorps anti-cytochrome P450 1A de morue a été démontré avec les protéines des trois espèces de cyprinidés, il est désormais possible de développer une technique immunochimique quantitative par dosage ELISA, qui serait plus opérationnelle que la détection de type Western blot.

Enfin, la transformation logarithmique des données EROD a permis d'obtenir une quantification adéquate des écarts entre groupes de poissons. De l'utilisation de tests paramétriques et des calculs de risques associés, il a ensuite été possible d'en déduire cinq classes de « qualité EROD ».

5.2 Bilan méthodologique

Les objectifs de ce travail étaient ambitieux de par l'étendue des questions abordées sur un seul biomarqueur. De ce fait, l'impossibilité de traiter en profondeur chacune des problématiques est une source d'insatisfaction, d'autant plus que chaque réponse fait naître d'autres questions...Heureusement, dans le cas du biomarqueur étudié, une bibliographie extrêmement fournie a permis de relier nos résultats avec d'autres résultats similaires sur d'autres espèces ou avec des conditions expérimentales comparables. D'autre part, ce travail a bénéficié de l'expérience du laboratoire acquise depuis 1987 et des données résultantes sur des milliers de poissons.

L'apport principal de ce travail ne réside alors plus tant dans les résultats d'expériences pris individuellement que dans la démarche d'ensemble et dans la recherche de cohérence globale, rendues possibles par la volonté de réaliser des expériences sur un nombre restreint d'espèces sur le terrain et en laboratoire. Cette méthodologie de validation d'un outil biochimique de surveillance des écosystèmes est une approche de portée générale qui dépasse le cadre de la mesure de l'activité EROD. En effet, la connaissance des valeurs non perturbées, la quantification des facteurs de variabilité, l'interprétation pertinente du "signal" ainsi que la recherche de mesures complémentaires sont des points à aborder pour toute variable biologique susceptible d'être utilisée comme outil de surveillance. La réflexion autour des notions de risque (de première et de seconde espèce) est également à conduire dans toute recherche de critères de qualité pour l'environnement.

5.3 Perspectives

Actuellement, les gestionnaires soucieux de l'environnement disposent d'une palette d'outils à différents niveaux d'organisation biologique. Les biomarqueurs biochimiques traduisent une réponse précoce de l'organisme donc un effet éventuellement réversible. Ils sont de fait un complément évident des programmes de surveillance chimique.

Pour permettre de situer, un biomarqueur entre l'exposition de l'organisme à une molécule et un effet sur la population de poissons, il faut continuer à mettre en place des zones ateliers avec coopérations inter équipes et pluridisciplinaires[63] (Lafaurie *et al.*, 1992 ; Johnson *et al.*, 1995). Toutes les questions posées par la description du milieu naturel ne peuvent en effet être résolues par des expérimentations en laboratoire ou en mésocosme.

Etant donné l'intérêt de la mesure de l'activité EROD et pour favoriser son développement, il paraît indispensable d'engager dès à présent, des études de standardisation et de normalisation de la méthode (Goksøyr et Förlin, 1992). D'autant plus que la faisabilité de l'intercalibration a été démontrée récemment (Stagg et Addison, 1995 ; Van den Heuvel *et al.*, 1995).

Le suivi, dans des sites à risque, d'espèces de poissons sentinelles est une bonne indication de la qualité du milieu. En effet, les poissons, au sommet de la chaîne alimentaire des écosystèmes aquatiques, sont généralement considérés comme représentatifs de la santé de l'écosystème dans sa globalité, car ils intègrent tous les stress biotiques et abiotiques qui agissent sur l'écosystème (Adams *et al.*, 1993). Les poissons sont donc des éléments incontournables pour l'étude des écosystèmes aquatiques tout en constituant une source protéique cruciale pour l'humanité. Ce sont des indicateurs médiatiques, dont l'utilisation est susceptible de promouvoir la demande sociale pour un environnement de qualité (Porcher, 1997). Une variable biologique pertinente pour les poissons peut l'être aussi pour l'homme et donc évaluer indirectement un risque pour celui-ci.

L'utilisation d'une nouvelle variable biologique en routine dans un programme de biosurveillance doit être pensée de façon rigoureuse. Toutefois, l'utilisation de l'EROD en est au point de maturité suffisante pour que toute nouvelle avancée scientifique ne puisse provenir que d'une accumulation de données routinières[64]. L'intégration de ce biomarqueur dans le cadre du RHP serait à ce titre particulièrement féconde.

---

[63] Comme l'illustrent bien les résultats des études sur Vernaison et Serrières.

[64] La normalisation de l'IBG a été revue en 1992 après plusieurs années de routine.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ADAMS S.M. (1990) Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. *In ADAMS S.M. (ed) « Biological indicators of stress in fish ».* American Fisheris Soc. Bethesda, Maryland, USA, 1-8.

ADAMS S.M., BROWN A.M. et GOEDE R.W. (1993) A quantitative health assessment index for rapid evaluation of fish condition in the field. *Transactions of the American Fisheries Society, 122*: 63-73.

ADAMS S.M., HAM K.D., GREELEY M.S., LEHEW R.F., HINTON D.E. et SAYLOR C.F. (1996) Downstream gradients in bioindicator responses : point source contaminant effects on fish health. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 53*: 2177-2187.

ADAMS S.M., SHUGART L.R., SOUTHWORTH G.R. et HINTON D.E. (1990) Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. *Mac CARTHY J.F. and SHUGART L.R. (eds) "Biomarkers of environmental contamination"* Lewis Publishers, Boca Raton, Floride, USA: 333-353.

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. *Marine Environmental Research, 31*: 137-144.

AHOKAS J.T., HOLDWAY D.A., BRENNAN S.E., GOUDEY R.W. et BIBROWSKA H.B. (1994) MFO activity in carp (*Cyprinus carpio*) exposed to treated pulp and paper mill effluent in lake Coleman, Victoria, Australia, in relation to AOX, EOX and muscle PCDD, PCDF. *Environmental Toxicology and Chemistry, 13*: 41-50.

ANDERSON M.J., MILLER M.R. et HINTON D.E. (1996) *In vitro* modulation of 17-beta-estradiol-induced vitellogenin synthesis : effects of cytochrome P4501A1 inducing compounds on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver cells. *Aquatic Toxicology, 34*: 327-350.

ANDERSSON T. et KOIVUSAARI U. (1985) Influence of environmental temperature on the induction of xenobiotic metabolism by B-naphthoflavone in rainbow trout, *Salmo gairdneri. Toxicology and Applied Pharmacology, 80*: 43-50.

ANDERSSON T., FORLIN L., HARDIG J. et LARSSON A. (1988) Physiological disturbances in fish living in coastal water polluted with bleached kraft pulp mill effluents. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 45*: 1525-1536.

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*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 45*: 132-137.

ARUKWE A. et GOKSOYR A. (1997) Changes in three hepatic cytochrome P450 subfamilies during a reproductive cycle in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *The Journal of Experimental Zoology, 277*: 313-325.

ASOKAN P., DAS M., DIXIT R. et MUKHTAR H. (1985) Interaction of certain metal ions with aryl hydrocarbon hydroxylase of rat lung microsomes. *Acta Pharmacology and Toxicology, 57:* 72-77.

ASPLUND L., GRAFSTROM A.K., HAGLUND P., JANSSON B., JARNBERG U., MACE D., STRANDELL M. et DE WIT C. (1990) Analysis of non-ortho polychlorinated biphenyls and polychlorinated naphthalenes in Swedish dioxin survey samples. *Chemosphere, 20 (10-12)*: 1481-1488.

ATTRILL M.J. et DEPLEDGE M.H. (1997) Community and population indicators of ecosystem health : targeting links between levels of biological organisation. *Aquatic Toxicology, 38*: 183-197.

ATUMA S.S., LINDER C.E., ANDERSSON O., BERGH A., HANSSON L. et WICKLUND-GLYNN A. (1996) CB153 as indicator for congener specific determination of PCBs in diverse fish species from Swedish waters. *Chemosphere, 33 (8)*: 1459-1464.

BALK L., LARSSON A. et FORLIN L. (1996) Baseline studies of biomarkers in the feral female perch (*Perca fluviatilis*) as tools in biological monitoring of anthropogenic substances. *Marine Environmental Research, 42 (1-4)*: 203-208.

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. Thèse de l'Université de Liège, 193p.

BERNET B. (1960) Recherches biologiques sur les populations de *Gobio gobio* (Linné 1758) de la Nivelle (fleuve côtier du Pays Basque). *Annales de la Station Centrale d'Hydrobiologie Appliquée, 8*: 127-180.

BESSELINK H.T., VAN SANTEN E., VORSTMAN W., VETHAAK A.D., KOEMAN J.H. et BROUWER A. (1997) High induction of cytochrome P4501A activity without changes in retinoid and thyroid hormone levels in flounder (*Platichthys flesus*) exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Environmental Toxicology and Chemistry, 16 (4)*: 816-823.

BEYER J., SANDVIK M., HYLLAND K., FJELD E., EGAAS E., AAS E., SKARE J.U. et GOKSOYR A. (1996) Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) exposed by caging to polluted sediments in Sorfjorden, Norway. *Aquatic Toxicology, 36*: 75-98.

BLANDIN P. et LAMOTTE M. (1985) Ecologie des systèmes et aménagement : fondements théoriques et principes méthodologiques. *In : "Fondements rationnels de l'aménagement d'un territoire" LAMOTTE M. (Ed.) ; Masson, Paris* : 139-162.

BOGE G., BUSSIERE D. et PERES G. (1988) Effets du chrome hexavalent sur les fonctions de la bordure en brosse de l'intestin de la truite arc en ciel (*Salmo gairdneri* R.). *Water Research, 22 (4)*: 441-447.

BOGE G., RIGAL A. et PERES G. (1983) Etude des effets du sulfate de calcium et du sulfate de potassium sur différentes activités enzymatiques de l'intestin de la truite (*Salmo gairdneri* R.) lors de la production de chocs thermiques. *Cahiers du Laboratoire de Montereau, 14*: 13-16

BOUVET Y., PATTEE E. et MASLIN J.L. (1992) Comparaison de la variabilité génétique de deux espèces de poissons, l'ombre commun et le gardon, dans un fleuve aménagé. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture, 324*: 26-35.

BOUVET Y., SOEWARDI K. et PATTEE E. (1991) The discrimination of roach *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758) populations in different parts of a river system. An investigation using biochemical markers. *Hydrobiologia, 209*: 161-167.

BRANCHAUD A., GENDRON A., FORTIN R., ANDERSON P.D. et SPEAR P.A. (1995) Vitamin A stores, teratogenesis, and EROD activity in white sucker, *Catostomus commersoni*, from Rivière des Prairies near Montréal and a reference site. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 52*: 1703-1713.

BROADBANK R. (1991) The PCB peril in perspective. *Process Engineering, July*: 41-44.

BRUGGEMAN W.A., OPPERHUIZEN A., WIJBENGA A. et HUTZINGER O. (1984) Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish. *Toxicological and Environmental Chemistry, 7*: 173-189.

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 (3)*: 201-268.

BUHL-MORTENSEN L. (1996) Type-II statistical errors in environmental science and the precautionary principle. *Marine Pollution Bulletin, 32 (7)*: 528-531.

BURGEOT T. (1994) L'éthoxyrésorufine O Dééthylase, les adduits à l'ADN et les micronuclei dans les organismes marins. Application à la surveillance des effets biologiques sur les côtes françaises. Thèse de l'Université de Nantes. 267p.

BURNISON B.K., HODSON P.V., NUTTLEY D.J. et EFLER S. (1996) A bleached-kraft effluent fraction causing induction of a fish mixed-function oxygenase enzyme. *Environmental Toxicology and Chemistry, 15 (9)*: 1524-1531.

CALOW P. (1991) Physiological costs of combating chemical toxicants : ecological implications. *Comparative Biochemistry and Physiology, 100C*: 3-6.

CARREL G., PONT D. et RIVIER B. (1995) Variabilité temporelle des peuplements piscicoles dans la section médiane du Bas-Rhône. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture, 337-338-339*: 101-111.

CELANDER M. et FORLIN L. (1992) Quantification of cytochrome P4501A1 and catalytic activities in liver microsomes of isosafrol-and-B-naphthoflavone-treated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Marine Environmental Research, 34*: 123-126.

CHAN Z. et HOLLEBONE B.R. (1995) A QSAR for steroidal compound interaction with cytochrome P450 1A1. *Environmental Toxicology and Chemistry, 14 (4)*: 597-603.

CHAPMAN P.M. (1991) Environmental quality criteria : what type should we be developing ? *Environmental Science and Technology, 25 (8)*: 1353-1359.

CHEVREUIL M., GRANIER L. et CARRU A.M. (1995) Relationship between biological parameters and bioaccumulation of some organochlorines (pesticides, PCB) by fishes in the River Seine (France). *Water, Air and Soil Pollution, 81*: 107-120.

CLARK K.E., GOBAS F.A.P.C. et MACKAY D. (1990) Model of organic chemical uptake and clearance by fish from food and water. *Environmental Science and Technology, 24 (8)*: 1203-1213.

CLEMONS J.H., VAN DEN HEUVEL M.R., STEGEMAN J.J., DIXON D.G. et BOLS N.C. (1994) Comparison of toxic equivalent factors for selected dioxin and furan congeners derived using fish and mammalian liver cell lines. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 51*: 1577-1584.

COLLIER T.K. et VARANASI U. (1994) Hepatic activities of xenobiotic metabolizing enzymes and biliary levels of xenobiotics in English sole (*Parophrys vetulus*) exposed to environmental contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 20*: 462-473.

COLLIER T.K., CONNOR S.D., EBERHART B.T.L., ANULACION B.F., GOKSOYR A. et VARANASI U. (1992) Using cytochrome P450 to monitor the aquatic environment : initial results from regional and national surveys. *Marine Environmental Research, 34*: 195-199.

CORISTINE S., HAFFNER G.D., CIBOROWSKI J.J.H., LAZAR R., NANNI M.E. et METCALFE C.D. (1996) Elimination rates of selected di-ortho, and non-ortho substituted polychlorinated biphenyls in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry, 15 (8)*: 1382-1387.

CORMIER S.M. et DANIEL B.F. (1994) Biomarkers : taking the science forward (editorial). *Environmental Toxicology and Chemistry, 13 (7)*: 1011-1012.

DAVIES J.M., BELL J.S. et HOUGHTON C. (1984) A comparison of the levels of hepatic aryl hydrocarbon hydroxylase in fish caught close to distant from North sea oil fields. *Marine Environmental Research, 14:* 23-45.

DAVILA D.R., MOUNHO B.J. et BURCHIEL S.W. (1997) Toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to the human immune system : models and mechanisms. *Toxicology and Ecotoxicology News, 4 (1)*: 5-9.

DE BOER J., STRONCK C.J.N., TRAAG W.A. et VAN DE MEER J. (1993) Non-ortho and mono-ortho substituted chlorobiphenyls and chlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in marine and freshwater fish and shellfish from The Netherlands. *Chemosphere, 26 (10)*: 1823-1842.

DEVAUX A. et MONOD G. (1987) PCB and p,p'-DDE in lake Geneva brown trout (*Salmo trutta* L.), and their use as bioenergetic indicators. *Environmental Monitoring and Assessment, 9* : 105-114.

DEVAUX A., PESONEN M. et MONOD G. (1997) Alkaline Comet assay in rainbow trout hepatocytes. *Toxicology in vitro, 11*: 71-79.

DEVAUX A., PESONEN M., MONOD G. et ANDERSSON T. (1992) Potentiation of BNF induction of cytochrome P4501A1 by glucocorticoids in primary culture of rainbow trout hepatocytes. *Marine Environmental Research, 34*: 93-96.

DI GIULIO R.T., HABIG C. et GALLAGHER E.P. (1993) Effects of black rock harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish. *Aquatic Toxicology, 26*: 1-22.

EGGENS M.L. et GALGANI F. (1992) Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in flatfish : fast determination with a fluorescence plate-reader. *Marine Environmental Research, 33*: 213-221.

EGGENS M.L., VETHAAK A.D., LEAVER M.J., HORBACH G.J.M.J., BOON J.P. et SEINEN W. (1996) Differences in CYP1A response between flounder (*Platichthys flesus*) and plaice (*Pleuronectes platessa*) after long-term exposure to harbour dredged spoil in a mesocosm study. *Chemosphere, 32 (7)*: 1357-1380.

ELSKUS A.A. et STEGEMAN J.J. (1989) Induced cytochrome P-450 in *Fundulus heteroclitus* associated with environmental contamination by polychlorinated biphenyls and polynuclear aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research, 27*: 31-50.

FAESSEL B., ROGER M.C. AND CAZIN B. (1993) Incidence de rejets ponctuels et diffus sur les communautés d'invertébrés benthiques d'un cours d'eau du Beaujolais : l'Ardières. *Annals of Limnology, 29(3-4)*: 307-323.

FAO (1996) MEDPOL biomonitoring programme. Interlaboratory comparison of ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity. FIR/MEDPOL/BIO/INTER1 , 7p.

FENET H. (1997) Les biomarqueurs chez l'anguille européenne en cage : application à la surveillance des eaux superficielles. Thèse de l'Université de Montpellier I. 151p.

FENET H., CASELLAS C. et BONTOUX J. (1996) Hepatic enzymatic activities of the European eel *Anguilla anguilla* as a tool for biomonitoring freshwater streams : laboratory and field caging studies. *Water Science and Technology, 33 (6)*: 321-329.

FLAMMARION P., MIGEON B. et GARRIC J. (1996) Joint effects of copper sulphate and methidathion on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) EROD and AChE activities. *The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 56, 3*: 440-445.

FORLIN L. et CELANDER M. (1993) Induction of cytochrome P450 1A in teleosts : environmental monitoring in Swedish fresh, brackish and marine waters. *Aquatic Toxicology, 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.

FORLIN L., ANDERSSON T., KOIVUSAARI U. et HANSSON T. (1984) Influence of biological and environmental factors on hepatic steroid and xenobiotic metabolism in fish : interaction with PCB and beta-naphthoflavone. *Marine Environmental Research, 14*: 47-58.

GALGANI F., BOCQUENE G., LUCON M., GRZEBYK D., LETROUIT D.F. et CLAISSE D. (1991) EROD measurements in fish from the northwest part of France. *Marine Pollution Bulletin, 22 (10)*: 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. Rapport Cemagref. 33p.

GOKSOYR A. et FORLIN L. (1992) The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology, 22*: 287-312.

GOKSOYR A., ANDERSSON T., BUHLER D.R., STEGEMAN J.J., WILLIAMS D.E. et FORLIN L. (1991) Immunochemical cross-reactivity of beta-naphthoflavone-inducible cytochrome P450 (P450IA) in liver microsomes from different fish species and rat. *Fish Physiology and Biochemistry, 9 (1)*: 1-13.

HAASCH M.L., QUARDOKUS E.M., SUTHERLAND L.A., GOODRICH M.S. et LECH J.J. (1993) Hepatic CYP1A1 induction in rainbow trout by continuous flowthrough exposure to beta-naphtoflavone. *Fundamental and Applied Toxicology, 20*: 72-82.

HABASHY A.P. (1974) Age, growth, spawning and some biochemical data in the chub (*Leuciscus cephalus*, L.) in the Rouchovanka creek. *Zoologicke Listy, 23 (1)*: 71-83.

HAHN M.E. et STEGEMAN J.J. (1990) Sustained induction of cytochrome P4501A1 mRNA, protein and catalytic activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran (2,3,7,8-TCDF) in the marine teleost *Stenotomus chrysops*. *Toxicologist, 10*: 28-34.

HAHN M.E., POLAND A., GLOVER E. et STEGEMAN J.J. (1992) The Ah receptor in marine animals : phylogenetic distribution and relationship to P4501A inducibility. *Marine Environmental Research, 34*: 87-92.

HAHN M.E., WOODIN B.R. et STEGEMAN J.J. (1989) Induction of cytochrome P450E (P4501A1) by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran (2,3,7,8-TCDF) in the marine fish scup (*Stenotomus chrysops*). *Marine Environmental Research, 28*: 61-65.

HAYNES D.B. et BRODZIAK J.K.T. (1997) Reply : efficiency and bias of estimators and sampling designs for determining length-weight relationships of fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 54*: 744-745.

HILBORN R. (1996) Risk analysis in fisheries and natural resource management. *Human and Ecological Risk Assessment, 2 (4)*: 655-659.

HOLLEBONE B.R., BROWNLEE L.J., DAVIS D., MICHELIN N. et PURDY D. (1995) A mechanistic structure-activity relationship for hepatic polysubstrate monooxygenase. *Environmental Toxicology and Chemistry, 14 (1)*: 29-41.

HUET M. (1949) Aperçu des relations entre la pente et les populations piscicoles des eaux courantes. *Schweiz. Z. Hydrol. 11(3-4)*: 332-351.

HUGGETT R.J., KIMERLE R.A., MEHRLE P.M. et BERGMAN H.L. (1992) *"Biomarkers : biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress."*, SETAC Special Publications Series, Lewis Publishers, Chelsea, US, 347p.

HUSOY A.M., MYERS M.S. et GOKSOYR A. (1996) Cellular localization of cytochrome P450 (CYP1A) induction and histology in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and European flounder (*Platichthys flesus*) after environmental exposure to contaminants by caging in Sorfjorden, Norway. *Aquatic Toxicology, 36*: 53-74.

HUSOY A.M., WILLIS M.J., MYERS M.S., COLLIER T.K. et GOKSOYR A. (1993) Immunohistochemical localization of cytochrome P450 1A1 in different organs of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *The Science of the Total Environment, suppl.*: 671-680.

HUUSKONEN S., RASANEN T., KOPONEN K. et LINDSTROM-SEPPA P. (1995) Time-course studies of the biotransformation enzymes in control rainbow trout when adjusting to new habitats. *Marine Environmental Research, 39*: 79-83.

IOANNIDES C. et PARKE D.V. (1993) Induction of cytochrome P4501 as an indicator of potential chemical carcinogenesis. *Drug Metabolism Reviews, 25 (4)*: 485-501.

JENSEN R.K., CULLUM M.E., DEYO J. et ZILE M.H. (1987) Vitamin A metabolism in rats chronically treated with 3,3',4,4',5,5'-hexabromobiphenyl. *Biochimica et Biophysica Acta, 926*: 310-320.

JIMENEZ B.D., BURTIS L.S., EZELL G.H., EGAN B.Z., LEE N.E., BEAUCHAMP J.J. et McCARTHY J.F. (1988) The mixed function oxidase system of bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus* : correlation of activities in experimental and wild fish. *Environmental Toxicology and Chemistry, 7*: 623-634.

JOHNSON A.R. (1988) Diagnostic variables as predictors of ecological risk. *Environmental management, 12 (4):* 515-523.

JOHNSON B.L., RICHARSON W.B. et NAIMO T.J. (1995) Past, present, and future concepts in large river ecology. How rivers function and how human activities influence river processes. *BioScience, 45 (3)*: 134-141.

KERSTING K. (1988) Normalized ecosystem strain in micro-ecosystems using different sets of state variables. *Verh. Internat. Verein. Limnol., 23*: 1641-1646.

KESTEMONT P. (1987) Etude du cycle reproducteur du goujon, *Gobio gobio* L. 1.Variations saisonnières dans l'histologie de l'ovaire. *Journal of Applied Ichthyology, 3*: 145-157.

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*). *Aquatic Toxicology, 8*: 231-241.

KLEINOW K.M., HAASCH M.L., WILLIAMS D.E. et LECH J.J. (1990) A comparison of hepatic P450 induction in rat and trout (*Oncorhynchus mykiss*) : delineation of the site of resistance of fish to phenobarbital-type inducers. *Comparative Biochemistry and Physiology, 96C (2)*: 259-270.

KLOEPPER-SAMS P.J. et BENTON E. (1994) Exposure of fish to biologically treated bleached-kraft effluent. 2. Induction of hepatic cytochrome P4501A in Mountain whitefish (*Proposium williamsoni*) and other species. *Environmental Toxicology and Chemistry, 13 (9)*: 1483-1496.

KLOEPPER-SAMS P.J. et BENTON E. (1995) Application of a sensitive chemiluminescent technique for comparison of cytochrome P4501A induction in hepatic and intestinal tissues of fish exposed to bleached kraft mill effluent. *Marine Environmental Research, 39*: 213-218.

KLOEPPER-SAMS P.J. et STEGEMAN J.J. (1988) Induction of cytochrome P-450 in *Fundulus heteroclitus* : enzyme activity, immunochemical and nucleic acid studies. *Marine Environmental Research, 24*: 21-25.

KLOEPPER-SAMS P.J. et STEGEMAN J.J. (1989) The temporal relationships between P450E protein content, catalytic activity, and mRNA levels in the teleost *Fundulus heteroclitus* following treatment with B-Naphthoflavone. *Archives of Biochemistry and Biophysics, 268 (2)*: 525-535.

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 (1)*: 38-46.

KLOEPPER-SAMS P.J., SWANSON S.M., MARCHANT T., SCHRYER R. et OWENS J.W. (1994) Exposure of fish to biologically treated bleached-kraft effluent. 1. Biochemical, physiological and pathological assessment of Rocky mountain whitefish *(Proposium williamsoni)* and Longnose sucker (*Catostomus catostomus*). *Environmental Toxicology and Chemistry, 13 (9)*: 1469-1482.

KOHLER A. et PLUTA J.H. (1995) Lysosomal injury and MFO activity in the liver of flounder (*Platichthys flesus* L.) in relation to histopathology of hepatic degeneration and carcinogenesis. *Marine Environmental Research, 39*: 255-260.

KOSMALA A., MIGEON B., FLAMMARION P. et GARRIC J. Impact assessment of a wastewater treatment plant using fish biomarker EROD : field and on-site experiments. *Ecotoxicology and Environmental Safety, sous presse.*

KRAIEM M. (1980) Structure et fonctionnement des écosystèmes du Haut-Rhône français. XXI : Contribution à l'étude du régime alimentaire de *Barbus Barbus* (L.1758) (Poissons, Cyprinidae). *Bulletin Français de Pisciculture, 278*: 1-10.

LAEMMLI U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature (Lond.) 227:* 680-685.

LAFAURIE M., GIUDICELLI J., CARRIERE S., LEMAIRE P., MATHIEU A. et NEGRE Y. (1989) Pollutant biotransformation in marine teleost fish : use in environmental health evaluation. *Advances in Applied Biotechnology Series, 5*, 141-152.

LAFAURIE M., NARBONNE J.F. et GALGANI F. (1992) Indicateurs biochimiques de contamination de l'environnement marin. *Analusis magazine, 20 (6)*: 27-33.

LAFONT M. (1989) Contribution à la gestion des eaux continentales : utilisation des oligochètes comme descripteurs de l'état biologique et du degré de pollution des eaux et des sédiments. Thèse de doctorat d'état de l'Université de Lyon I. 311p.

LAFONT M. et MOUTHON J. (1990) Comparaison de méthodes pour évaluer la toxicité des sédiments. Rapport Cemagref. 24p.

LAFONT M., CAMUS J.C. et ROSSO A. (1996) Superficial and hyporheic oligochaete communities as indicators of pollution and water exchange in the river Moselle, France. *Hydrobiologia, 334*: 147-155.

LAFONT M., MOUTHON J. et ROSSO A. (1996) Etude des mollusques et des oligochètes dans les sédiments de cours d'eau du bassin du Rhône. Rapport Cemagref. 100p.

LAMBERT Y. et DUTIL J.D. (1997) Can simple condition indices be used to monitor and quantify seasonal changes in the energy reserves of Atlantic cod (*Gadus morhua*) ? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 54 (suppl. 1)*: 104-112.

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 Physiology and Biochemistry, 10 (4):* 291-301.

LDA 26 (1995) Mise en oeuvre de la technique « multi résidus » organiques sur les parties non solubles des eaux superficielles (sédiments-matières en suspension). 17p.

LDA 26 (1997) Extraction et analyse des micropolluants organiques sur les dreissènes. 58p.

LE CREN E.D. (1951) The lenght-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). *Journal of Animal Ecology, 20*: 201-215.

LECH J.J., VODICNIK M.J. et ELCOMBE C.R. (1982) Induction of monooxygenase activity in fish. *In : Aquatic Toxicology, WEBER L.J. (Ed)*: 107-148.

LESTER S.M., BRAUNBECK T.A., TEH S.J., STEGEMAN J.J., MILLER M.R. et HINTON D.E. (1993) Hepatic cellular distribution of cytochrome P450 1A1 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) : an immunohisto-and cytochemical study. *Cancer Research, 53*: 3700-3706.

LEVEQUE C. (1997) Etat de santé des écosystèmes aquatiques : l'intérêt des variables biologiques. In *séminaire national « Les variables biologiques : des indicateurs de l'état de santé des écosystèmes aquatiques » Ministère de l'Environnement, 2-3 Novembre 1994*, Cemagref Editions, 13-26.

LEVINE S.L., ORIS J.T. et WISSING T.E. (1994) Comparison of P-4501A1 monooxygenase induction in gizzard shad (*Dorosoma cepedianum*) following intraperitoneal injection or continuous waterborne-exposure with benzo(a)pyrene : temporal and dose-dependent studies. *Aquatic Toxicology, 30:* 61-75.

LEVINE S.L., ORIS J.T. et WISSING T.E. (1995) Influence of environmental factors on the physiological condition and hepatic ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity of gizzard shad (*Dorosoma cepedianum). Environmental Toxicology and Chemistry, 14 (1)*: 123-128.

LINDSTROM-SEPPA P. et HANNINEN O. (1988) Sampling and storage conditions of rainbow trout liver affects monooxygenase and conjugation enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology, 89C (2)*: 221-224.

LINDSTROM-SEPPA P. et OIKARI A. (1988) Hepatic xenobiotic bio-transformation in fishes exposed to pulpmill effluents. *Water Science and Technology, 20 (2)*: 167-170.

LINDSTROM-SEPPA P. et OIKARI A. (1990) Biotransformation activities of feral fish in waters receiving bleached pulp mill effluents. *Environmental Toxicology and Chemistry, 9*: 1415-1424.

LOPEZ-BAREA J. (1994) Biomarkers in ecotoxicology : an overview. Congrès de Bâles EUROTOX, août 1994.

LOWRY O. H, ROSEBROUGH N. J., FARR A. L. et RANDALL R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenolreagent. *J. Biol. Chem. 193:* 265-275.

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. *Aquatic Toxicology, 37*: 113-123.

MADENJIAN C.P., WHITTLE D.M., ELROD J.H., O'GORMAN R. et OWENS R.W. (1995) Use of a simulation model to reconstruct PCB concentrations in prey of Lake Ontario Lake trout. *Environmental Science and Technology, 29 (10)*: 2610-2615.

MALINS D.C., MCCAIN B.B., LANDAHL J.T., MYERS M.S., KRAHN M.M., BROWN D.W., CHAN S.L. et ROUBAL W.T. (1988) Neoplastic and other diseases in fish in relation to toxic chemicals : an overview. *Aquatic Toxicology, 11*: 43-67.

MANN R.H.K. (1976) Observations on the age, growth, reproduction and food of the chub *Squalius cephalus* (L.) in the River Stour, Dorset. *Journal of Fish Biology, 8*: 265-288.

MASFARAUD J.F. (1992) Les activités enzymatiques à cytochrome P450 comme marqueur biologique de pollution : relation entre l'activité 7-éthoxyrésorufine O-dééthylase et la formation d'adduits à l'ADN chez la truite (*Oncorhynchus mykiss*) exposée au benzo(a)pyrène. Thèse de l'Université de Lyon I. 166p.

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 HUGGETT R.J., KIMERLE R.A., MEHRLE P.M. et BERGMAN H.L. (Eds), Biomarkers: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress*, Lewis Publishers, Chelsea, Etats-Unis, 5-86.

MC CARTHY J.F. (1990) Concluding remarks : implementation of a biomarker-based environmental monitoring program. *In MC CARTHY J.F. et SHUGART L.R.(Eds). Biomarkers of environmental contamination.* Lewis Publishers, Boca Raton, Floride, USA, 429-439.

MC DONALD S.J., WILLETT K.L., THOMSEN J., BEATTY K.B., CONNOR K., NARASIMHAN T.R., ERICKSON C.M. et SAFE S.H. (1996) Subletal detoxification responses to contaminant exposure associated with offshore production platforms. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 53*: 2606-2617.

MELANCON M.J., ELCOMBE C.R., VODICNIK M.J et LECH J.J. (1981) Induction of cytochromes P450 and mixed-function oxidase activity by polychlorinated biphenyls and beta-naphthoflavone in carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology, 69C*: 219-226.

MONOD G. (1997) Les biomarqueurs d'exposition. In *séminaire national « Les variables biologiques : des indicateurs de l'état de santé des écosystèmes aquatiques » Ministère de l'Environnement, 2-3 Novembre 1994*, Cemagref Editions, 145-148.

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. *The Science of the Total Environment, 73:* 189-201.

MORAND M. (1997) Etude Saône Rhône : les poissons. Etat sanitaire et hygiénique. Campagnes 1995-1996. Rapport du LDA39. 70 p.

MUNKITTRICK K.R. et DIXON D.G. (1989) Use of white sucker (*Catostomus commersoni*) populations to assess the health of aquatic ecosystems exposed to low-level contaminant stress. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 46*: 1455-1462.

MUNKITTRICK K.R., VAN DER KRAAK G.J., MAC MASTER M.E., PORTT C.B., VAN DEN HEUVEL M.R. et SERVOS M.R. (1994) Survey of receiving-water environmental impacts associated with discharges from pulp mills. 2. Gonad size, liver size, hepatic EROD activity and plasma sex steroid levels in white sucker. *Environmental Toxicology and Chemistry, 13 (7)*: 1089-1101.

NAMOUR, P (1992) *Les mono-oxygénases de poissons, un outil pour la caractérisation des pollutions chroniques.* Etudes Cemagref, Paris. 232p.

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. *Comparative Biochemistry and Physiology, 100C*: 37-42.

NEBERT D.W., NELSON D.R., COON M.J., ESTABROOK R.W., FEYEREISEN R., FUJII-KURIYAMA Y., GONZALEZ F.J., GUENGERICH F.P., GUNSALUS I.C., JOHNSON E.F., LOPER J. C., SATO R., WATERMAN M.R. et WAXMANN D.J. (1991) The P450 superfamily : update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA and Cell biology, 10 (1):* 1-14.

NEWSTED J.L., GIESY J.P., ANKLEY G.T., TILLITT D.E., CRAWFORD R.A., GOOCH J.W., JONEST P.D. et DENISON M.S. (1995) Development of toxic equivalency factors for PCB congeners and the assessment of TCDD and PCB mixtures in rainbow trout. *Environmental Toxicity and Chemistry, 14 (5)*: 861-871.

NIIMI A.J. et OLIVER B.G. (1983) Biological half-lives of polychlorinated biphenyl (PCB) congeners in whole fish and muscle of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 40*: 1388-1394.

NIXON S.C., MAINSTONE C.P., IVERSEN T.M., KRISTENSEN P., JEPPESEN E., FRIBERG N., PAPATHANASSIOU E., JENSEN, A. et PEDERSEN F. (1996) The harmonised monitoring and classification of ecological quality of surface waters in the European union. Final report. WRc Ref CO 4150. 289p.

ORTIZ DE MONTELLANO P.R. et REICH N.O (1986) Inhibition of cytochrome P-450 enzymes. *In : « Cytochrome P-450, structure, mechanism and biochemistry » ORTIZ DE MONTELLANO P.R (Ed). Plenum Press, New York and London* : 273-314.

OTT W.R. (1995) *Environmental statistics and data analysis*. Lewis Publishers, Boca Raton, Floride, USA, 313p.

PAJOR A.M., STEGEMAN J.J., THOMAS P. et WOODIN B.R. (1990) Feminization of the hepatic microsomal cytochrome P-450 system in brook trout by estradiol, testosterone, and pituitary factors. *The Journal of Experimental Zoology, 253*: 51-60.

PAYNE J.F. (1984) Mixed-function oxygenases in biological monitoring programs : review of potential usage in different phyla of aquatic animals. *In : "Ecotoxicological testing for the marine environment". PERSOONE G., JASPERS E. and CLAUS C. (Eds). State University Ghent and Inst. Mar. Scient. Res., Bredene, Belgium, Volume 1* : 625-655.

PAYNE J.F. et PENROSE W.R. (1975) Induction of aryl hydrocarbon (Benzo [a] pyrene) hydroxylase in fish by petroleum. *The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 14 (1)*: 112-116.

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

PAYNE J.F., FANCEY L.L., RAHIMTULA A.D. et PORTER E.L. (1987) Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring . *Comparative Biochemistry and Physiology, 86*: 233-245.

PESONEN M. et ANDERSSON T.B. (1997) Fish primary hepatocyte culture; an important model for xenobiotic metabolism and toxicity studies. *Aquatic Toxicology, 37*: 253-267.

PETERS L.D. et LIVINGSTONE D.R. (1995) Studies in cytochrome P4501A in early and adult life stages of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Marine Environmental Research, 39*: 5-9.

PHILIPPART J.C. (1972) Age de croissance du chevaine *Leuciscus cephalus* (L.) dans l'Ourthe et la Berwine. *Annales de la Société Royale Zoologique de Belgique, 102 (1-2)*: 47-81.

PHILIPPART J.C. (1987) Démographie, conservation et restauration du Barbeau fluviatile, *Barbus barbus* (Linné) (*Telestei, cyprinidae*) dans la Meuse et ses affluents. Quinze années de recherches. *Annales de la Société Royale Zoologique de Belgique, 117 (1)*: 49-62.

PHILIPPART J.C. (1989) Ecologie des populations de poissons et caractéristiques physiques et chimiques des rivières dans le bassin de la Meuse Belge. *Bulletin de la Société Géographique de Liège, 25*: 175-198.

PICKETT S.T.A., KOLASA J., ARMESTO J.J. et COLLINS S.L. (1989) The ecological concept of disturbance and its expression at various hierarchical levels. *Oikos, 54*: 129-136.

POLAND A. et KNUTSON J.C. (1982) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons : examination of the mechanism of toxicity. *Annals Review of Pharmacology and Toxicology, 22*: 517-554.

PONCIN P. (1988) Le contrôle environnemental et hormonal de la reproduction en captivité du barbeau et du chevaine. *Cahiers d'Ethologie Appliquée, 8 (2)*: 173-331.

PORCHER J.P. (1997) L'exemple du réseau hydrobiologique et piscicole du Conseil Supérieur de la Pêche. In *séminaire national « Les variables biologiques : des indicateurs de l'état de santé des écosystèmes aquatiques » Ministère de l'Environnement, 2-3 Novembre 1994*, Cemagref Editions, 275-280.

POUILLY M. (1994) Relations entre l'habitat physique et les poissons des zones à cyprinidés rhéophiles dans trois cours d'eau du bassin rhodanien : vers une simulation de la capacité d'accueil pour les peuplements. Thèse de l'Université Lyon I, 206p.

RAPPORT D.J. (1992) Evaluating ecosystem health. *Journal of Aquatic Ecosystem Health, 1*: 15-24.

RAPPORT D.J., REGIER H.A. et HUTCHINSON T.C. (1985) Ecosystem behaviour under stress. *The American Naturalist, 125 (5)*: 617-640.

RICHERT C. (1994) Comparaison de marqueurs biochimiques chez les poissons et d'indicateurs écologiques pour le diagnostic *in situ* de la pollution toxique dans les cours d'eau. Thèse de l'Université Claude Bernard-Lyon I, 190p.

RODOLICO S., GIOVINAZZO R. et MOSCONI M. (1997) Comparison between ELISAs and traditional analytical methods to determine pesticide pollution in water. *The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 58*: 644-650.

ROFES G., SAVARY M. et VERREL J.L. (1981) Le prélèvement des sédiments en eau douce. Séminaire « stratégie de la mesure dans l'eau et dans l'air », Villeurbanne septembre 1981. 13p.

ROMAN G. (1996) Mise au point d'une méthodologie d'évaluation des concentrations sans effet des substances sur l'environnement aquatique. Thèse de l'Université de Rouen. 205p.

RONIS M.J.J., CELANDER M., FORLIN L. et BADGER T.M. (1992) The use of polyclonal antibodies raised against rat and trout cytochrome P450 CYP1A1 orthologues to monitor environmental induction in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Marine Environmental Research, 34*: 181-188.

SAFE S. (1990) Polychlorinated biphenyls (PCBs) dibenzo-p-Dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds : environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Critical Reviews in Toxicology, 21 (1)*: 51-87.

SANTOS M.A. et PACHECO M. (1996) *Anguilla anguilla* L. stress biomarkers recovery in clean water and secondary-treated pulp mill effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety, 35*: 96-100.

SCHINDLER D.W. (1987) Detecting ecosystem responses to anthropogenic stress. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 44*: 6-25.

SCHLENK D., PERKINS E.J., HAMILTON G., ZHANG Y.S. et LAYHER W. (1996) Correlation of hepatic biomarkers with whole animal and population-community metrics. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 53*: 2299-2309.

SIJM D.T.H.M. et OPPERHUIZEN A. (1989) Biotransformation of organic chemicals by fish : enzyme activities and reactions. *In : HUTZINGER O. (Ed). Handbook of Environmental Chemistry, vol. 2E, Reactions and Processes, Springer Verlag, Berlin*: 163-235.

SIJM D.T.H.M. et VAN DER LINDE A. (1995) Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. *Environmental Science and Technology, 29*: 2769-2777.

SIWICKI A.K., MORAND M. et POZET F. (1996) Comparative immunotoxicology : application of immunotoxicological biomarkers for predicting the immunotoxic effects of polluted aquatic environments. *In Biological monitoring of environmental contamination. SIWICKI A.K. (Ed.),* Inland Fisheries Inst., IRS, Olsztyn, 99-111.

SKAARE J.U., JENSEN E.G., GOKSOYR A. et EGGAS E. (1991) Response of xenobiotic metabolizing enzymes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to the mono-ortho substituted polychlorinated PCB congener 2,3', 4,4', 5-Pentachlorobiphenyl, PCB-118, detected by enzyme activities and immunochemical methods. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 20*: 349-352.

SLEIDERINK H.M., BEYER J., EVERAATS J.M. et BOON J.P. (1995) Influence of temperature on cytochrome P450 1A in dab (*Limanda limanda*) from the Southern North Sea : results from field surveys and a laboratory study. *Marine Environmental Research, 39*: 67-71.

SLOOFF W., VAN KREIJL C.F. et BAARS A.J. (1983) Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface waters in the Netherlands. *Aquatic Toxicology, 4*: 1-14.

SNEGAROFF J. et BACH J. (1989) Effects of the fungicide Prochloraz on xenobiotic metabolism in rainbow trout : inhibition *in vitro* and time course of induction *in vivo*. *Xenobiotica, 19 (3)*: 255-267.

SNOWBERGER GRAY 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. *The Journal of Experimental Zoology, 259*: 330-342.

SPILLMANN C.J. (1961) Poissons d'eau douce. in *Faune de France* P. Lechevalier (eds) Paris, France, 65p.

STAGG R.M. et ADDISON R.F. (1995) An inter-laboratory comparison of measurements of ethoxyresorufin O-deethylase activity in dab (*Limanda limanda*) liver. *Marine Environmental Research, 40*: 93-108.

STEGEMAN J.J., PAJOR A.M. et THOMAS P. (1982) Influence of estradiol and testosterone on cytochrome P-450 and monooxygenase activity in immature brook trout, *Salvelinus fontinalis. Biochemical Pharmacology, 31 (24)*: 3979-3989.

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. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 44*: 1270-1277.

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 MALINS D.C. et OSTRANDER G.K. (Eds), Aquatic toxicology : molecular, biochemical and cellular perspectives*, Lewis Publishers, Chelsea, Etats-Unis, 235-335.

STEGEMAN, J.J., BROUWER M., DI GIULIO T., FORLIN L., FOWLER B.A., SANDERS B.M. et VAN VELD P.A. (1992) Molecular responses to environmental contamination : enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. *In HUGGETT R.J., KIMERLE R.A., MEHRLE P.M. et BERGMAN H.L. (Eds), Biomarkers: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress*, Lewis Publishers, Chelsea, Etats-Unis, 235-335.

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. Environmental Toxicology and Chemistry, 16 (2)*: 214-219.

STOW C.A., JACKSON L.Y. et AMRHEIN J.F. (1997) An examination of the PCB:lipid relationship among individual fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 54:* 1031-1038.

SUTER II G.W. (1990) Use of biomarkers in ecological risk assessment. *In MC CARTHY J.F. et SHUGART L.R. Biomarkers of environmental contamination.* Lewis Publishers, Boca Raton, Floride, USA, 419-426.

SUTER II G.W. (1993) A critique of ecosystem health concepts and indexes. *Environmental Toxicology and Chemistry, 12*: 1533-1539.

TEH S.J., ADAMS S.M. et HINTON D.E. (1997) Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquatic Toxicology, 37*: 51-70.

TESTA B. et JENNER P. (1981) Inhibitors of cytochrome P-450s and their mecanism of action. *Drug Metabolism Reviews, 12(1)*: 1-117.

THEVENET A. (1995) Intégration des abris dans l'étude des relations entre l'habitat physique et les poissons de la zone à barbeaux. Rapport bibliographique de DEA. Cemagref division BELY. 41p.

TOMASSONE R., DERVIN C. et MASSON J. P. (1993) *Biométrie. Modélisation de phénomènes biologiques*. Masson, Paris. 553p.

UTIDA S., OIDE M. et OIDE H. (1968) Ionic effects on alkaline phosphatase activity in intestinal mucosa with special reference to sea-water adaptation of the Japanese eel, *Anguilla japonica. Comparative Biochemistry and Physiology, 27*: 239-249.

VALENTIN S. (1997) (coord.) Chute de Pierre Bénite : suivi de l'incidence du débit réservé dans le Vieux Rhône. Rapport Cemagref BELY. 140p.

VALENTIN S., CAPRA H., TORRE F., SOUCHON Y., FLAMMARION P. et GARRIC J. (1997) Aide à la définition de débits réservés dans le vieux Rhône de Péage de Roussillon : peuplements de poissons et approche par la méthode des microhabitats Rapport Cemagref BELY. 60p.

VAN DEN HEUVEL M.R., MUNKITTRICK K.R., STEGEMAN J.J. et DIXON D.G. (1995) Second-round interlaboratory comparison of hepatic ethoxyresorufin-O-deethylase activity in white sucker (*Catostomus commersoni*) exposed to bleached-kraft pulp mill effluent. *Environmental Toxicity and Chemistry, 14 (9)*: 1513-1520.

VAN DER OOST R., GOKSOYR A., CELANDER M., HEIDA H. et VERMEULEN N.P.E. (1996a) Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. *Aquatic Toxicology, 36*: 189-222.

VAN DER OOST R., HEIDA H., OPPERHUIZEN A. et VERMEULEN N.P.E. (1991) Interrelationships between bioaccumulation of organic trace pollutants (PCBs, organochlorine pesticides and PAHs), and MFO-induction in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, 100C (1-2)*: 43-47.

VAN DER OOST R., OPPERHUIZEN A., SATUMALAY K. et HEIDA H., VERMEULEN N.P.E. (1996b) Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). I. Bioaccumulation : biota-sediment ratios of PCBs, OCPs, PCDDs and PCDFs. *Aquatic Toxicology, 35*: 21-46.

VAN DER OOST R., VINDIMIAN E., VAN DEN BRINK P.J., SATUMALAY K., HEIDA H. et VERMEULEN N.P.E. (1997) Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). III. Statistical analyses of relationship between contaminant exposure and biomarkers. *Aquatic Toxicology, 39*: 45-75.

VAN DER WEIDEN M.E.J., CELANDER M., SEINEN W., VAN DER BERG M., GOKSOYR A. et FORLIN L. (1992) Effects of 2,3,7,8-TCDD and contaminated sediment on the cytochrome P4501A orthologue in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and carp (*Cyprinus carpio*), using catalytic and immunochemical techniques. *Marine Environmental Research, 34*: 215-219.

VAN DER WEIDEN M.E.J., CELANDER M., SEINEN W., VAN DER BERG M., GOKSOYR A. et FORLIN L. (1993) Induction of cytochrome P450 1A in fish treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin or chemically contaminated sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry, 12*: 989-999.

VAN VELD P.A., VOGELBEIN W.K., SMOLOWITZ R., WOODIN B.R. et STEGEMAN J.J. (1992) Cytochrome P450IA1 in hepatic lesions of a teleost fish (*Fundulus heteroclitus*) collected from a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated site. *Carcinogenesis, 3 (3)*: 505-507.

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. *Aquatic Toxicology, 1*: 49-67.

VERNEAUX J. (1981) Les poissons et la qualité des cours d'eau. *Annales Scientifiques de l'Université de Franche-Comté Besançon - Biologie animale, 4ème série, fasc. 2*: 33-41.

VINDIMIAN E. et GARRIC J. (1992) Bioessais et bioindicateurs de toxicité dans le milieu naturel. *Ministère de l'environnement. Etude inter-agences N°17*, 61 p.

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*). *Aquatic Toxicology, 21*: 255-266.

VINDIMIAN E., NAMOUR P., MUNOZ J.F., GRIL J.J., MIGEON B. et GARRIC J. (1993) Ethoxyresorufin-O-deethylase induction in fish from a watershed exposed to a non point source pollution of agricultural origin. *Water Research, 27 (3)*: 449-455.

WANG Y.G. (1997) Comment : efficiency and bias of estimators and sampling designs for determining length-weight relationships of fishes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 54*: 742-743.

WASSON J.G. (1997) Ecorégions et systèmes de référence. In *séminaire national « Les variables biologiques : des indicateurs de l'état de santé des écosystèmes aquatiques » Ministère de l'Environnement, 2-3 Novembre 1994*, Cemagref Editions, 55-66.

WATSON D.E. et GIULIO R.T.D. (1997) Hepatic CYP1A in brown bullhead catalyzes the binding of 2-aminoanthracene to DNA *in vivo* and *in vitro*. *Aquatic Toxicology, 37*: 21-36.

WEEKS B.A., ANDERSON D.P., DUFOUR A.P., FAIRBROTHER A., GOVEN A.J., LAHVIS G.P. et PETERS G. (1992) Immunological biomarkers to assess environmental stress. *In HUGGETT R.J., KIMERLE R.A., MEHRLE P.M. et BERGMAN H.L. (Eds), Biomarkers: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress*, Lewis Publishers, Chelsea, Etats-Unis, 211-234.

DOSAGE DE L'ACTIVITE EROD SUR MICROPLAQUE

Cette annexe décrit la mesure de l'activité enzymatique EROD (EthoxyRésorufine-O-Deéthylase) sur fraction post-mitochondriale (S9) d'homogénat de foie de poisson par une méthode fluorimétrique sur microplaque 96 puits.

On mesure l'augmentation de fluorescence du milieu réactionnel due à la transformation de la 7 éthoxyrésorufine en résorufine (cette dernière étant 100 fois plus fluorescente). La méthode traditionnelle avec lecture en spectrofluorimètre à cuve (Vindimian *et al.*, 1991) a été transposée en microplaque[1] (articles 3, 4).

La fluorescence des échantillons de foie est rapportée en quantité de résorufine par l'intermédiaire d'un étalon de rhodamine B. Par la suite, les activités EROD sont rapportées à la quantité de protéines du S9 par un dosage Lowry (1951) également réalisé sur microplaque (en spectrophotométrie).

Toutes les manipulations doivent être réalisées à l'abri des poussières et dans la mesure du possible à 4°C (bain de glace). La réaction enzymatique en microplaque doit être réalisée à 18-22 °C (ce qui nécessite la climatisation en période estivale).

A.1 Choix de l'étalon de fluorescence

Nous avons préféré la rhodamine B à la résorufine pour des questions de stabilité. En effet, si la résorufine perd 5% de fluorescence par jour à 4°C (et 2% par heure à 20°C), la rhodamine présente quant à elle une remarquable stabilité (<1% par semestre). En étalonnant une gamme de résorufine (dans un mélange réactionnel de dosage EROD) par rapport à la rhodamine on obtient alors un témoin stable dans le temps. Le coefficient de proportionnalité est égal au rapport des pentes i.e. 1,25 (Figure A-1).

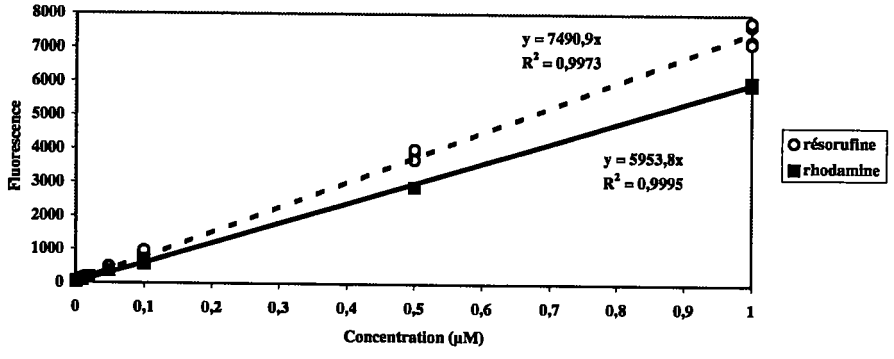


Figure A-1. Comparaison des gammes de fluorescence de la résorufine et de la rhodamine.

[1] à la différence près que la réaction enzymatique n'est pas stoppée par l'ajout d'acétone.

A.2 Paramètres du dosage

Les paramètres du dosage enzymatique sont conformes à ceux déterminés par Namour (1992) (en cuve) sur les cyprinidés que nous étudions. Les modifications concernent la concentration en NADPH que nous avons trouvée saturante à partir de 100 µM, ainsi que le choix de la température qui est indifférente entre 15 et 25°C (Tableau A-1). Comme remarqué dans l'article 4, les deux méthodes ne sont pas statistiquement différentes ce qui permet l'utilisation conjointe des données.

Tableau A-1. Paramètres du dosage EROD en cuve et en microplaque.

	cuve	microplaque
Tampon	Phosphate 100 mM	Phosphate 100 mM
pH	7,8	7,8
7-ERF	2 µM	2 µM
NADPH	50 µM	250 µM
température	20°C	ambiante (20-25°C)
cinétique	acétone à 6 minutes	lectures : 0-2-4 minutes
inhibiteur de protéases	-	PMSF : 0,2 mM

Comme conseillé par de nombreux auteurs, nous avons rajouté du PMSF (PhenylMethylSulfonylFluorure), un inhibiteur de protéases, à une concentration finale de 0,2 mM. Pour 32 échantillons de S9, les activités mesurées avec PMSF sont en moyenne 20% supérieures à celles mesurées sans PMSF. Toutefois, la différence n'est pas significative (test t pour mesures appariées, p=0,19).

A.3 Protocole de dosage EROD détaillé

A.3.1 Réactifs et tampons

- *Solution de KCl (150mM)*

dissoudre 11,2 g de KCl dans 1 litre d'eau ultra pure. Se conserve au frais (3-7°C) jusqu'à 6 mois.

- *Tampon phosphate (100mM, pH 7,8)*

solution A : 35,8 g de Na_2HPO_4, $12H_2O$ dans 1 litre d'eau ultra pure,

solution B : 3,40 g de KH_2PO_4 dans 250 ml d'eau ultra pure,

la solution A est ajustée à pH 7,8 avec la solution B.

Ajouter du PMSF (PhenylMethylSulfonylFluorure, PW=174,2) à raison de 35 mg pour 1 litre de tampon phosphate (0,2 mM final). Se conserve au frais (3-7°C) jusqu'à 6 mois.

- *Tampon phosphate-glycérol 20%*

Pour la conservation des homogénats de foie après la dissection, rajouter au tampon phosphate 20% de glycérol.

- *Solution de 7 éthoxyrésorufine (PW=241)*

Préparer à l'avance une solution saturée de 7 éthoxyrésorufine dans du DMSO. Cette solution se conserve à température ambiante et à l'obscurité. Préparer la solution de travail en mesurant la concentration de la solution précédente en colorimétrie (à 482 nm, le coefficient d'extinction est le suivant = $2{,}25.10^4\ M^{-1}cm^{-1}$). Calculer la dilution ad hoc pour la solution de travail : 46 µM. Se conserve à l'obscurité à température ambiante pendant 1 à 2 semaines.

- *Solution de NADPH (PW=833.4)*

Dissoudre 19,2 mg de NADPH dans 4 ml d'eau ultra pure. Se conserve 2 jours au frais.

- *Lowry*

Le jour même, préparer la solution de Lowry à l'avance en ajoutant 40 ml d'eau ultra pure dans un flacon de réactif de Lowry.

- *Folin*

Le jour même, préparer le réactif de Folin (diluer au 1/4 du Folin 2N dans de l'eau ultra pure).

- *Solutions de d'albumine sérique de boeuf*

Préparer 2 solutions de protéines (une à 0,4 g/l et l'autre à 2 g/l). Se conserve une semaine au frais (3-7°C).

- *Solution de rhodamine (PW=479)*

Lorsque l'étalon de rhodamine vient à manquer ou lorsque sa validité est douteuse (i.e. une fois par an), peser 25 mg de rhodamine B à dissoudre dans 250 ml de méthoxy-2-éthanol. Cette solution mère sera diluée au 1/20 ^{ième} puis au 1/104 ^{ième} dans du méthoxy-2-éthanol pour obtenir une solution à 0,1 mM à conserver au frais (3-7°C) et à l'obscurité dans des aliquots. Périodiquement, vérifier leur fluorescence avec une nouvelle solution de rhodamine et contre une nouvelle solution de résorufine.

A.3.2 Sacrifice des poissons et condition de stockage des échantillons

Après le nombre de jours choisis pour l'expérience ou après la pêche électrique, les poissons sont sacrifiés, et un morceau (<1g) de foie est rapidement prélevé sur chaque poisson.

Les échantillons de foie sont lavés dans une solution de KCl puis homogénéisés dans 2 ml (ou 4 ml selon la taille du poisson) de tampon phosphate au Potter Elvehgem avant d'être introduits dans des tubes cryogéniques (préalablement numérotés) et congelés dans de l'azote liquide. Puis les échantillons sont stockés à - 80°C (ou dans l'azote liquide) jusqu'à réalisation des dosages enzymatiques et protéiques. Un stockage à -20°C n'est pas suffisant pour maintenir l'intégrité enzymatique (mais pourrait être utilisé en cas d'urgence pour des durées inférieures à 24 heures).

A.3.3 Préparation de la fraction S9

- décongeler à 4°C les échantillons de façon aléatoire.
- centrifuger à 9000g à 4 °C pendant 10 minutes.
- récupérer les surnageants (fraction S9) et les conserver à 4°C jusqu'au dosage dans des tubes numérotés en verre.

A.3.4 Dosage de l'activité EROD

Chaque échantillon de S9 est dosé en triplicat ce qui permet de disposer 16 échantillons par microplaque (éviter les bords de la plaque). Sur chaque plaque on place en triplicat un témoin de rhodamine (Figure A-2).

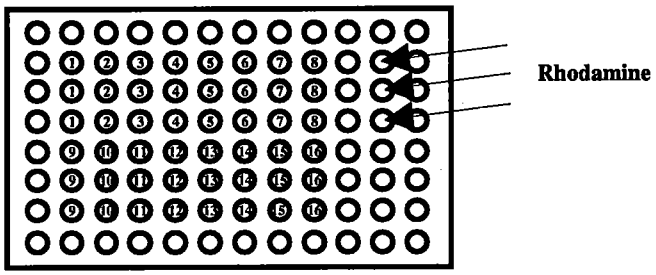


Figure A-2. Schéma d'une microplaque avec échantillon et témoin de fluorescence.

• introduire en triplicats et dans l'ordre suivant :
- 200 µl de tampon phosphate (100mM , pH 7,8)
- 10 µl de surnageant S9
- 10 µl de solution d'éthoxyrésorufine (concentration finale = 2 mM)
- 10 µl de solution de NADPH (concentration finale = 250 mM)

L'ajout de NADPH entraîne le démarrage de la cinétique enzymatique.

• lire au spectrofluorimètre aux temps suivants t = 0 ; t = 2 min ; t = 4 min aux longueurs d'onde d'émission et d'excitation de 530 et 590 nm.

A.3.5 Dosage des protéines

Le dosage des protéines doit être fait après le dosage enzymatique (plus sensible à la détérioration du matériel biologique). Il est réalisé à 690nm en spectrophotométrie à microplaque.

• pour la gamme étalon, introduire en duplicat les volumes d'albumine sérique de boeuf (BSA) et de tampon phosphate (100 mM, pH 7,8) suivants :

BSA 0,4 g/l µl	BSA 2 g/l µl	tampon µl	concentration g protéine/l
0	0	100	0
25	0	75	0,1
50	0	50	0,2
75	0	25	0,3
100	0	0	0,4
0	50	50	1
0	100	0	2

- introduire en duplicat 10 µl des échantillons et compléter avec 90 µl de tampon phosphate.
- ajouter dans chaque cuve 150 µl de solution de Lowry, agiter et attendre 20 min.
- ajouter 50 µl de réactif de Folin, agiter et attendre 30 min.
- lire la densité optique des microplaques au spectrophotomètre.

A.4 Quelques caractéristiques du dosage

A.4.1 Linéarité

La modélisation des cinétiques EROD par des polynômes de degré 2 donne un bon ajustement (Figure A-3). L'écart relatif entre la pente à un temps t et la dérivée au temps initial (qui donne la vitesse maximale donc l'activité enzymatique) est alors égal à 0,015 t (vérifié pour 18 échantillons). Autrement dit, l'erreur de linéarité pour le calcul d'activité enzymatique est égal à 1,5% par minute. Pour 4 minutes, temps minimum pour faire trois mesures à des pas de temps différents, l'écart de linéarité est donc de 6% systématiquement pour tous les échantillons.

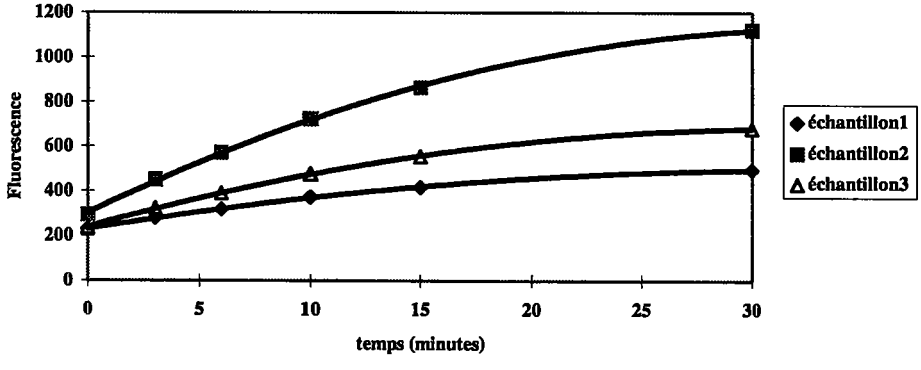


Figure A-3. Etude de la linéarité de la réaction enzymatique EROD sur trois échantillons.

A.4.2 Sensibilité

Nous avons testé l'influence, sur le calcul de l'activité enzymatique, d'une dilution de S9 jusqu'à 100 fois (Figure A-4). Cette expérience a permis de montrer d'une part que la concentration en protéines est sans influence de 0,1 à 10 g/l de S9, et d'autre part que la limite de détection de fluorescence en résorufine formée est de 1 nM, i.e. 0,23 pmol de résorufine. Pour un échantillon de S9 à 5g/l de protéines (moyenne observée) la limite d'activité EROD détectable est donc de 1,2 pmol/min/mg de protéines. Par ailleurs, la moyenne de dispersion de fluorescence des blancs (sans substrat) est de 10 unités de fluorescence, ce qui correspond à la même limite de détection en résorufine.

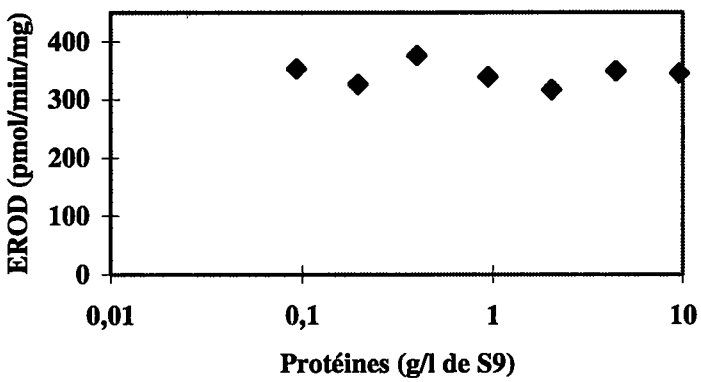


Figure A-4. Etude de la sensibilité du dosage EROD par dilution d'un échantillon.

Eggens et Galgani (1992) ont remarqué qu'à plus forte concentration protéique (à partir de 0,5 g/l dans le mélange réactionnel), l'activité EROD est plus faible que lorsque le mélange réactionnel est dilué. Mais, dans notre cas, les concentrations protéiques sont inférieures à cette limite : elles sont comprises généralement entre 1 et 10 g/l de S9 ce qui correspond à une gamme de 0,04-0,4 g/l dans le mélange réactionnel.

A.4.3 Reproductibilité et répétabilité

Nous avons évalué la reproductibilité sur un même foie à 7% et la répétabilité sur les trois réplicats de 100 échantillons à 3%.

A.5 Remarques finales

Enfin, nous présentons des résultats concernant d'une part la comparaison entre des dosages réalisés sur S9 et sur microsomes, et, d'autre part, la comparaison de la technique de dosage EROD développée au Cemagref avec les résultats d'autres laboratoires sur un même échantillon.

A.5.1 S9 ou microsome ?

Les activités EROD mesurées sur microsomes sont supérieures à celles mesurées sur S9 d'un facteur 2,5 ± 0,2 (R^2=0,98 ; N=23). Le choix de l'ultracentrifugation devrait donc s'imposer. Pourtant, étant donné le nombre d'échantillons à doser et la durée de l'ultracentrifugation (1 heure), nous avons préféré n'utiliser l'ultracentrifugation que pour les échantillons groupés en vue de la détection immunochimique. Il faut toutefois garder à l'esprit que la précision de la mesure pour les faibles activités (<10 pmol/min/mg) est de fait moins bonne pour les S9 que pour les microsomes.

A.5.2 Intercalibration avec d'autres laboratoires

Une étude coordonnée par le laboratoire de Toxicologie marine de la Faculté de Médecine de Nice a permis la comparaison des résultats de dosage EROD réalisés par 10 laboratoires, dont le Cemagref, sur des homogénats de foie de Loup (*Dicentrarchus labrax*) induits par du BaP (20 mg/kg) (FAO, 1996) (Tableau A-2).

Tableau A-2. Etude d'intercalibration de dosages EROD (pmol/min/mg de protéines) sur des échantillons de foie non-induits et induits par le BaP.

Laboratoire	S9/ microsomes	acétone/ cinétique	EROD (foie non-induit)	EROD (foie induit)	Taux d'induction
1	microsomes	acétone	6,9	79,9	11,6
2	microsomes	cinétique	13,2	123	9,3
2	microsomes	acétone	8,7	69,0	8,0
2	S9	cinétique	3,8	35,5	9,4
3	microsomes	cinétique	7,2	99,7	12,9
3	microsomes	acétone	15,9	165	10,4
3	S9	cinétique	3,7	39,4	10,8
4	microsomes	cinétique	0,6	5,4	9,3
5	microsomes	acétone	10,8	101,7	9,4
6	S9	cinétique	1,0	9,6	9,6
7	S9	cinétique	1,5	12,4	8,2
Cemagref-cuve	S9	acétone	10,6	96,4	8,3
Cemagref-plaque	**S9**	cinétique	**7,2**	**79,5**	**11,0**
9	microsomes	acétone	7,6	84,3	11,1
10	microsomes	acétone	0,5	15,2	30,4
10	S9	acétone	6,2	45,8	7,4
	Moyenne et IC95		6,6 (4,1 ; 9,0)	66,4 (42,0 ; 90,8)	11,1 (8,2 ; 13,9)

En ce qui concerne les activités brutes EROD, les résultats ne sont pas homogènes d'un laboratoire à l'autre mais les taux d'induction sont davantage cohérents. Les moyennes et intervalles de confiance permettent de situer les résultats de chaque laboratoire par rapport à l'ensemble des autres résultats. Il ressort de cette analyse que la méthode microplaque du Cemagref se trouve dans la moyenne des résultats tant en données brutes EROD qu'en taux d'induction.

DONNEES EROD

données en pmol/min/mg protéines : moyenne géométrique (IC 95%) (N)

Chevaine

Année	Station	Saison	EROD		
			Femelles	**Mâles**	**Juvéniles**
1995	Ain	Printemps	4 (2 ; 9) (10)	9 (3 ; 23) (6)	13 (7 ; 27) (10)
		Automne	2 (1 ; 3) (9)	5 (1 ; 25) (4)	6 (3 ; 14) (10)
	Ardèche	Printemps	4 (1 ; 8) (10)	7 (5 ; 11) (10)	-
		Automne	3 (1 ; 6) (9)	8 (5 ; 11) (10)	15 (9 ; 26) (10)
	Drôme	Printemps	3 (2 ; 4) (10)	6 (2 ; 12) (6)	15 (3 ; 75) (4)
		Automne	2 (1 ; 3) (9)	6 (4 ; 9) (10)	3 (1 ; 8) (10)
	Cendrecourt	Printemps	3 (1 ; 8) (10)	12 (9 ; 15) (8)	34 (22 ; 53) (10)
		Automne	5 (3 ; 8) (10)	12 (9 ; 17) (9)	17 (10 ; 26) (10)
	Trévoux	Printemps	4 (0 ; 14) (4)	12 (1)	-
	Collonges	Printemps	3 (1 ; 8) (9)	-	-
	Jons	Printemps	12 (1 ; 71) (3)	36 (2)	24 (17 ; 32) (10)
	Vernaison	Printemps	14 (9 ; 24) (10)	29 (3 ; 310) (10)	16 (8 ; 32) (10)
		Automne	32 (15 ; 59) (8)	22 (10 ; 45) (10)	68 (28 ; 165) (10)
	Chasse	Printemps	29 (2)	66 (11 ; 364) (6)	-
	Serrières	Printemps	22 (6 ; 68) (9)	98 (83 ; 131) (10)	71 (32 ; 152) (6)
		Automne	45 (28 ; 72) (10)	54 (36 ; 82) (3)	292 (173 ; 402) (10)
1996	Ain	Printemps	3 (2 ; 6) (10)	9 (5 ; 15) (10)	17 (7 ; 38) (10)
		Automne	2 (1 ; 3) (10)	7 (4 ; 12) (9)	13 (10 ; 17) (7)
	Cendrecourt	Printemps	3 (2 ; 5) (10)	5 (4 ; 7) (10)	12 (8 ;18) (10);
	Trévoux	Printemps	19 (11 ; 29) (10)	36 (21 ; 62) (7)	31 (21 ; 45) (10)
	Collonges	Printemps	14 (10 ; 21) (10)	37 (23 ; 59) (10)	-
	Jons	Printemps	24 (16 ; 36) (10)	28 (17 ; 45) (8)	-
	Vernaison	Printemps	6 (2 ; 21) (10)	46 (17 ; 122) (10)	29 (10 ; 80) (10)
		Automne	13 (6 ; 24) (10)	17 (11 ; 26) (10)	25 (16 ; 40) (10)
	Chasse	Printemps	110 (54 ; 223) (10)	205 (2)	-
	Serrières	Printemps	19 (8 ; 42) (10)	310 (150 ; 630) (3)	168 (83 ; 346) (7)
		Automne	32 (23 ; 44) (10)	31 (18 ; 50) (10)	54 (41 ; 68) (10)

données en pmol/min/mg protéines : moyenne géométrique (IC 95%) (N)

Barbeau

Année	Station	Saison	EROD		
			Femelles	Mâles	Juvéniles
1995	Ain	Printemps	5 (1 ; 35) (4)	10 (5 ; 19) (9)	9 (2 ; 41) (3)
		Automne	9 (4 ; 18) (3)	6 (2 ; 17) (5)	-
	Ardèche	Printemps	3 (2)	10 (2 ; 55) (5)	-
	Drôme	Printemps	14 (4 ; 18) (10)	6 (2 ; 14) (9)	2 (1 ; 12) (3)
		Automne	12 (7 ; 20) (10)	3 (1 ; 5) (9)	2 (1 ; 5) (10)
	Cendrecourt	Automne	-	5 (2 ; 28) (3)	-
	Vernaison	Automne	3 (1 ; 8) (7)	3 (1 ; 7) (9)	-
1996	Ain	Printemps	5 (1 ; 29) (5)	5 (2 ; 10) (10)	2 (1 ; 5) (10)
		Automne	12 (2)	3 (1 ; 11) (5)	2 (1 ; 4) (6)
	Serrières	Automne	25 (8 ; 73) (5)	50 (11 ; 214) (3)	-

Goujon

Année	Station	Saison	EROD	
			Femelles	Mâles
1995	Ain	Printemps	13 (8 ; 24) (5)	26 (15 ; 44) (7)
		Automne	26 (19 ; 39) (10)	15 (9 ; 29) (10)
	Ardèche	Printemps	5 (2 ; 10) (10)	28 (20 ; 40) (10)
		Automne	15 (8 ; 26) (10)	14 (9 ; 20) (10)
	Cendrecourt	Printemps	7 (2 ; 29) (5)	37 (21 ; 64) (5)
		Automne	27 (21 ; 34) (10)	29 (21 ; 39) (10)
	Vernaison	Printemps	5 (2)	-
		Automne	94 (59 ; 163) (10)	-
	Serrières	Printemps	9 (3 ; 24) (10)	33 (6 ; 147) (7)
		Automne	147 (89 ; 244) (6)	-
1996	Ain	Printemps	4 (1 ; 12) (10)	19 (6 ; 54) (10)
		Automne	19 (11 ; 32) (10)	19 (12 ; 29) (10)
	Cendrecourt	Printemps	5 (2 ; 13) (8)	16 (12 ; 22) (10)
	Vernaison	Printemps	9 (2 ; 32) (10)	48 (17 ; 133) (5)
		Automne	29 (17 ; 48) (10)	31 (19 ; 54) (10)
	Serrières	Printemps	44 (15 ; 121) (5)	73 (26 ; 199) (7)
		Automne	45 (26 ; 73) (10)	54 (36 ; 80) (10)

Liste des articles

Article 1
FLAMMARION P., GARRIC J. et G. MONOD (1997) Utilisation de l'activité enzymatique EROD chez les poissons des hydrosystèmes continentaux, *in* LAGADIC L., CAQUET T., AMIARD J.C. et F. RAMADE (eds.) *"Utilisation des biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement"* Tec & Doc Lavoisier, Paris, 57-75.

Article 2
FLAMMARION P. et J. GARRIC (1996) Qualité des milieux aquatiques continentaux : intérêts de l'utilisation d'un marqueur biochimique chez le poisson. *La Houille Blanche*, N°5, 19-24.

Article 3
FLAMMARION P. et J. GARRIC (1997) Cyprinids EROD activities in low contaminated rivers : a relevant statistical approach to estimate reference levels for EROD biomarker? *Chemosphere*, 35, 10, 2375-2388.

Article 4
FLAMMARION P., MIGEON B. et J. GARRIC. Statistical analysis of cyprinids EROD data in a large French watershed. *Ecotoxicology and Environmental Safety, sous presse.*

Article 5
FLAMMARION P., FORTIER V., MIGEON B., MORFIN P. et J. GARRIC. Variabilities in Cytochrome P450 1A induction in gudgeon (*Gobio gobio*) as a field and laboratory fish species. *Environmental Toxicology and Chemistry, soumis.*

Article 6
FLAMMARION P., MIGEON B. et J. GARRIC (1996) Joint effects of copper sulphate and methidathion on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) EROD and AChE activities. *The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 56, 3, 440-445.

Article 7
FLAMMARION P., MIGEON B., URIOS S., MORFIN P. et J. GARRIC. Effect of Methidathion on the cytochrome P450 1A in the cyprinid fish gudgeon (*Gobio gobio*). *Aquatic Toxicology, soumis.*

Article 8
DEVAUX A., FLAMMARION P., BERNARDON V., GARRIC J. et G. MONOD. Monitoring of the chemical pollution of the river Rhône through measurement of DNA damage and cytochrome P4501A induction in chub (*Leuciscus cephalus*). *Marine Environmental Research, sous presse.*

Article 1

FLAMMARION P., GARRIC J. et G. MONOD (1997) Utilisation de l'activité enzymatique EROD chez les poissons des hydrosystèmes continentaux, *in* LAGADIC L., CAQUET T., AMIARD J.C. et F. RAMADE (eds.) *"Utilisation des biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement"* Tec & Doc Lavoisier, Paris, 57-75.

Utilisation de l'activité enzymatique EROD chez les poissons des hydrosystèmes continentaux

Patrick FLAMMARION[a], Jeanne GARRIC[a] et Gilles MONOD[b]

[a]Laboratoire d'Ecotoxicologie, Division Biologie des Ecosystèmes aquatiques, Cemagref, 3 bis Quai Chauveau, CP 220, 69336 Lyon cedex 09

[b]Unité d'Ecotoxicologie Aquatique, INRA,
65, rue de St.-Brieuc, 35042 Rennes cedex

Introduction

Au plan réglementaire en France et en Europe, l'affirmation du principe de gestion globale des milieux aquatiques et de préservation de l'intégrité biologique de ces milieux, définis dans la loi sur l'eau du 3 janvier 1992, ainsi que la proposition de Directive européenne sur la qualité écologique des eaux (94/C 222/06), confirment la nécessité de disposer d'outils sensibles et pertinents d'évaluation de la santé globale des milieux aquatiques.

Dans ce contexte, le développement et l'utilisation de marqueurs biochimiques mesurés au niveau de l'individu est une méthodologie, complémentaire des mesures analytiques et biocénotiques plus classiques, qui apparaît aujourd'hui très attractive, tant pour une meilleure compréhension des modes d'action des toxiques sur les organismes qu'en vue de la gestion opérationnelle des milieux aquatiques.

Certains de ces biomarqueurs sont caractérisés par des réponses rapides et relativement spécifiques. C'est le cas du cytochrome P4501A (voir Monod: P4501A1 chez les poissons, ce volume) dont la synthèse est induite, de manière réversible (Melancon *et al.*, 1987) chez les organismes en présence de certaines familles de contaminants, en particulier les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) ou les polychlorobiphényles (PCBs), largement présents dans les milieux aquatiques.

Ses caractéristiques ont permis d'envisager ce biomarqueur comme un outil du suivi de la qualité du milieu, utile à la fois pour caractériser de façon précoce des zones de pollution, tenter d'en identifier les sources et mesurer l'efficacité de mesures de restauration. Ainsi son utilisation a été proposée par Payne dès 1976. Depuis, de très nombreux auteurs ont décrit des inductions significatives du cytochrome P450 (forme 1A) chez des poissons d'eau douce en relation avec des situations de pollution

continentale d'origines diverses (Kezic *et al.*, 1983; Payne *et al.*, 1987; Haux et Förlin, 1988; Linström-Seppa et Oikari, 1988; Monod *et al.*, 1988; Vindimian et Garric, 1989).
Sur le terrain, différentes activités catalytiques sont utilisées pour mesurer une induction du cytochrome P 4501A: "Aryl Hydrocarbon Hydroxylase" (AHH), Ethoxy Coumarine O-Déethylase (ECOD), Ethoxy Résorufine O-Déethylase (EROD), Pentoxy Résorufine O-Déethylase (PROD). En outre la détection immunochimique de la partie protéique du cytochrome P4501A est conseillée pour affiner l'interprétation des réponses d'induction ainsi obtenues (Stegeman *et al.*, 1987; Goksøyr et Förlin, 1992).
Parmi les mesures d'activités monooxygénases, l'activité EROD apparaît comme la plus sensible. En effet, l'activité ECOD, dans le cas de poissons pêchés dans le Rhône et soumis à une contamination par les PCB, présente une induction d'activité moindre que l'AHH et l'EROD (Monod *et al.*, 1988). Le fait que la mesure de l'ECOD soit moins sensible que la mesure de l'EROD est confirmé par d'autres études (Ahokas *et al.*, 1994; Larsson *et al.*, 1988). De même l'activité PROD, contrairement aux activités AHH et EROD, ne permet pas de discriminer des stations polluées par des effluents d'industries papetières (Lindström-Seppa et Oikari, 1990). Enfin, bien que les activités AHH et EROD soit effectivement bien corrélées, l'activité EROD demeure en général plus sensible que l'activité AHH et la mesure en est par ailleurs plus aisée (Stegeman *et al.*, 1987; Monod *et al.*, 1988).
Compte tenu de cette sensibilité établie de la mesure de l'activité EROD dans de nombreuses situations de terrain, nous nous intéresserons plus particulièrement aux études reposant sur la mesure de cette dernière activité.
La très grande majorité des travaux publiés à ce jour concerne le dosage enzymatique et, dans une moindre mesure, le dosage immunochimique. Nous ferons ici allusion à cette méthode complémentaire dont le développement récent (depuis Stegeman *et al.*, 1987) a été conditionné par la purification du cytochrome P4501A et l'obtention d'anticorps spécifiques pour les poissons.
La première partie de ce chapitre effectue une présentation synthétique de travaux représentatifs de l'utilisation *in situ* de ce biomarqueur. Une deuxième partie est consacrée à l'analyse de cas mettant en évidence l'influence de facteurs autres que la contamination chimique du milieu. Les données obtenues *in situ* et permettant d'étudier les relations susceptibles d'exister entre la réponse du biomarqueur "induction du cytochrome P4501A" avec les réponses fournies par d'autres variables biologiques font l'objet de la troisième partie de ce chapitre. La dernière partie est consacrée au bilan que nous pouvons tirer actuellement de l'utilisation de ce biomarqueur.

1. Mise en évidence de l'induction du cytochrome P4501A in situ

L'intérêt de l'utilisation de ce biomarqueur en tant qu'indicateur de pollution est confirmé par de très nombreuses études de terrain dont quelques exemples récents, sélectionnés en eau douce, sont proposés dans le tableau 1.

Tableau 1

Ce tableau résume les situations les plus couramment décrites dans la littérature concernant les milieux d'eau douce. Les polluants auxquels ces situations font référence concernent ceux présents dans les effluents de l'industrie papetière (les procédés de blanchiment au chlore des pâtes à papier conduisant en particulier à la formation de composés organochlorés particulièrement inducteurs) ainsi que les PCBs, les HAPs et les dioxines. Les corrélations entre l'induction de l'EROD et la présence caractérisée d'une pollution sont en général fortes.

Des situations moins caractérisées quant à la nature de la contamination ont également été étudiées, en aval de pollution chimique industrielle (Vindimian *et al.*, 1991; Ueng *et al.*, 1992) ou en relation avec une contamination agricole diffuse (Vindimian *et al.*, 1993). Dans ces situations les auteurs ont également pu conclure à une relation positive entre la contamination chimique et la réponse de l'activité EROD.

Dans le tableau 1 ont été portées les activités EROD mesurées chez des poissons provenant de sites identifiés par les auteurs comme constituant des sites de référence (c'est à dire des stations situées à l'écart de toute influence polluante). Ces activités, mesurées sur une même espèce, montrent des variations parfois importantes qui sont dues, soit à des mesures effectuées sur des stations de référence différentes (pour un même auteur) (Monod *et al.*, 1988 ; Lindström-Seppa et Oikari, 1990; Vindimian *et al.*, 1991 ; Ahokas *et al.*, 1994), soit à des périodes d'échantillonnage différentes d'une étude à une autre (Masfaraud *et al.*, 1990), soit à des méthodes de mesures différentes (voir plus bas).

Plusieurs auteurs mettent en évidence des relations étroites entre la réponse de l'activité EROD notamment et les concentrations en composés inducteurs (HAP, PCB, dioxines) détectables dans l'environnement ou les organismes (tableau 2).

Tableau 2

Dans ces exemples, seuls Van der Oost *et al.* (1994), contrairement aux résultats qu'ils proposaient en 1991 sur les mêmes sites, ne mettent pas en évidence d'induction significative de l'activité EROD, en relation avec un gradient de contamination par les

PCB, les HAP et les molécules organochlorées dont les concentrations ont été mesurées dans les sédiments et les poissons (gardons) des deux lacs étudiés. Dans ce cas il semble que le gradient de contamination mesuré dans les poissons soit insuffisant pour permettre la mise en évidence d'une induction significative de l'activité EROD. En effet ces auteurs ont remarqué que les concentrations en PCB mesurées dans les poissons n'excèdaient pas 100 µg/kg (poids frais). Ces concentrations sont environ 15 à 50 fois plus faibles que celles mesurées par Monod *et al.* (1988) qui avaient noté, dans ces conditions, une induction significative des activités monooxygénases de poissons du Rhône.

Bien que la pollution soit le facteur qui explique en majeure partie la variation d'activité entre des organismes provenant de sites de référence et de sites contaminés, d'autres facteurs, tels que l'espèce, le sexe ou la saison de prélèvement doivent être pris en compte par les auteurs dans l'analyse de leurs résultats et, souvent, dans la conception et la mise en oeuvre de leur plan d'échantillonnage.

2. Influences de facteurs autres que la pollution chimique

Outre le facteur pollution, les études réalisées en milieu naturel doivent tenir compte des facteurs biotiques (espèce, sexe) et abiotiques (température, saison). En effet, ces facteurs sont susceptibles de moduler les niveaux de cytochrome P4501A et/ou les activité enzymatiques associées (Tableau 3). Par ailleurs, l'activité EROD varie considérablement d'un tissu à un autre. La plupart des travaux se sont concentrés sur des dosages hépatiques en raison de l'activité de biotransformation relativement élevée rencontrée dans le foie.

Tableau 3: facteurs modulateurs du système P450 chez le poisson (d'après Goksøyr et Förlin, 1992).

espèce	sexe	régime alimentaire
lignée	température	agents inducteurs
âge	maturation sexuelle	agents antagonistes

Nous ne détaillerons pas ici les effets de ces paramètres sur l'induction de l'activité EROD (voir Monod: P4501A1 chez les poissons dans ce volume et Andersson et Förlin, 1992), mais nous tirerons de la littérature récente des exemples illustrant cette influence. Nous aborderons également le rôle susceptible d'être joué par la méthode de mesure elle-même.

Influence des conditions de mesure

Un dosage enzymatique tel que celui de l'activité EROD ne présente pas de difficultés majeures de mise en oeuvre. Mais compte tenu de la fragilité bien connue des systèmes enzymatiques, plusieurs facteurs intervenant à partir du moment où les poissons sont capturés jusqu'à celui du dosage enzymatique sont susceptibles d'influer sur le résultat.

Un temps le plus court possible doit séparer le moment de la capture de celui où le poisson est sacrifié et le foie prélevé. En effet, des conditions de stress (anoxie) peuvent conduire à une perte importante d'activité enzymatique (Monod *et al.*, données non publiées).

Dans certaines conditions les dosages enzymatiques peuvent être réalisés sur le site de capture (voir le chapitre de Galgani *et al.*, ce volume). Mais si les prélèvements (en général les foies) sont ramenés au laboratoire, leur bonne conservation est essentielle. La plupart des auteurs utilisent l'azote liquide. Différents travaux ont montré que les conditions de conservation du foie étaient susceptibles d'influer sur l'activité EROD mesurée *in fine*. Ainsi Monod et Vindimian (1991) ont pu observer qu'une homogénéisation du foie en présence de glycérol avant immersion dans l'azote liquide permettait de conserver une activité EROD hépatique deux fois plus élevée, ce résultat s'expliquant sans doute par le pouvoir protecteur du glycérol vis-à-vis des structures membranaires dont dépend l'activité du cytochrome P4501A.

Si les méthodes de préparation des fractions subcellulaires permettant le dosage de l'activité EROD (fraction postmitochondriale ou fraction microsomale) sont assez bien standardisées, les conditions de dosages proprement dites sont en revanche relativement variables d'une étude à une autre et cette variabilité n'est pas sans conséquences sur les résultats obtenus. Une étude récente de Munkittrick *et al.* (1993) a abordé cette question à travers une comparaison inter-laboratoires portant sur les activités EROD de fractions subcellulaires issues de poissons exposés ou non à des effluents de papeteries. Les conditions de dosage (pH, température et concentration en substrat) de l'EROD qui variaient considérablement entre les laboratoires participants, et la mesure de la teneur en protéines des fractions, ont très sensiblement influencé les valeurs absolues trouvées, mais les taux d'induction déduits par les différents participants ont été approximativement les mêmes d'un laboratoire à un autre.

Les précautions requises pour assurer une qualité élevée aux dosages enzymatiques ne semblent pas toutes indispensables pour assurer des dosages immunochimiques fiables. Ainsi Förlin et Celander (1993) ont observé un taux d'induction identique par un dosage enzymatique réalisé sur des microsomes préparés à partir de foies directement immergés dans l'azote liquide après prélèvement, ou par un dosage immunochimique réalisé sur

des microsomes issus de foies congelés sur de la glace carbonique, alors que ces derniers microsomes n'exprimaient pas d'activité EROD significative.
Ainsi, dans les cas où l'activité catalytique est bien conservée, il y a concordance (bonnes corrélations statistiques) entre les mesures de l'activité et la détection immunochimique sur un certain nombre d'espèces (Collier *et al.*, 1992; Van der Weiden *et al.*, 1993). La détection immunochimique fait donc "double emploi" dans ces situations. Cependant, une induction reste mesurable par voie immunochimique même s'il y a perte (inhibition et/ou altération de l'enzyme) de l'activité.

L'espèce
Les niveaux de base de l'activité EROD (en situation non polluée) ainsi que les activités en situation d'induction varient selon les espèces (Monod *et al.*, 1988; Collier *et al.* 1995; Vindimian *et al.*, 1991). Même si cela ne remet pas en cause le diagnostic d'induction. Cette variabilité liée à l'espèce est un fait bien établi en situation contrôlée de laboratoire (voir Monod: P4501A1 chez les poissons, ce volume). En milieu naturel, l'habitat (pélagique ou benthique), en général caractéristique d'une espèce, pourrait être un facteur important à considérer. Ainsi Vindimian *et al.* (1991) notent une induction beaucoup plus importante chez le barbeau (*Barbus fluviatilis*) que chez les hotus (*Chondrostoma nasus*) et chevaines (*Leuciscus cephalus*) prélevés sur les mêmes stations, en aval d'un effluent industriel. Un tel résultat est sans doute à mettre en relation avec le caractère benthique du barbeau qui l'amène à demeurer en contact permanent et étroit avec un substrat et une alimentation plus contaminés.

Le sexe des individus et la saison
Les poissons mâles présentent en général des activités EROD supérieures à celles des femelles, avec un facteur compris entre 1 et 2 selon la saison et l'espèce (Vindimian *et al.*, 1991); le dimorphisme sexuel apparaissant nettement plus important durant la période de maturation sexuelle (Masfaraud *et al.*, 1990 ; Figure 1).

Figure 1: Activité EROD hépatique chez des hotus (*Chondrostoma nasus*) capturés en amont (station de référence) et en aval d'une usine d'élimination des PCBs durant l'année 1988 (d'après Masfaraud *et al.*, 1990).

Sur une seule période d'échantillonnage, certains auteurs n'ont pas observé de différence liée au sexe (Andersson *et al.*, 1988; Gagnon *et al.*, 1995). Ces résultats contradictoires peuvent être dus à des caractéristiques spécifiques de l'induction, mais surtout à l'influence des hormones de reproduction sur les activités monooxygénases, qui explique la variation saisonnière de ces activités (Jimenez et Stegeman, 1990; revue de

Andersson et Förlin, 1992). La période de l'année durant laquelle se déroule la maturation sexuelle variant d'une espèce à une autre, le dimorphisme sexuel caractérisant l'EROD apparaît lui aussi à des périodes de l'année variables suivant l'espèce. Par ailleurs, différentes études ont montré que les individus juvéniles présentaient des activités supérieures à celles des individus mâtures avec des niveaux d'activité similaires quelque soit leur sexe (Förlin et Lindman, 1981; Singh *et al.*, 1985). Ainsi pour s'affranchir des variations de niveaux d'activités liées au sexe certains auteurs préconisent la mesure des activités monooxygénases sur des juvéniles (Collier *et al.*, 1995). Cette condition est en général très difficile à remplir en eau douce où les stades juvéniles sont souvent plus difficilement accessibles que les stades plus âgés. En revanche, la mesure de l'activité EROD à partir d'individus adultes d'un seul sexe et de préférence mâle (moins de variation saisonnière que les individus femelles) est nettement plus réalisable.

La température de l'eau

L'influence directe de la température de l'eau sur l'induction des activités monooxygénases, et de l'EROD en particulier, est délicate à visualiser dans le cadre d'études de terrain, dans la mesure où la température de l'eau est un facteur déterminant du processus de maturation sexuelle chez les poissons (voir plus haut).

Certes, l'influence de la température sur la cinétique d'induction de l'EROD a pu être montrée en conditions très contrôlées de laboratoire (Andersson et Förlin, 1992; Jimenez *et al.*, 1990). Ainsi l'induction est obtenue plus rapidement et atteint des niveaux plus élevés chez des truites acclimatées à 17°C que chez celles acclimatées à 5°C (Andersson et Koivusaari, 1985). Mais sur le terrain la température de l'eau ne paraît ni modifier l'induction (Andersson *et al.*, 1988), ni expliquer les différences d'induction (Vindimian *et al.*, 1991). Ces résultats confortent ainsi l'influence de la saison, en liaison avec la maturation sexuelle plutôt qu'avec la température.

L'alimentation

Il est très difficile d'estimer finement la qualité de l'alimentation ingérée par un poisson durant la période précédant sa capture. Or l'influence directe de la qualité de la nourriture sur les activités monooxygénases et leur induction, a été mise en évidence en laboratoire (Ankley et Blazer, 1988). L'alimentation peut également jouer un rôle indirect comme facteur de variabilité individuelle. C'est en effet une voie majeure de contamination des poissons par des micropolluants persistants et potentiellement bioaccumulés, parmi lesquels se trouvent des inducteurs connus du cytochrome P4501A (PCB notamment).

Inhibition et interactions

Outre les études de laboratoire qui ont mis en évidence l'existence de phénomènes d'inhibition des activités monooxygénases en présence de fortes doses de composés inducteurs hépatotoxiques ou d'inhibiteurs organiques ou métalliques (voir Monod: P4501A1 chez les poissons, ce volume), plusieurs auteurs ont également signalé ces phénomènes *in situ*. Ainsi l'activité EROD dosée sur des individus péchés sur les stations les plus proches de sites de rejets peut être plus faible que celle mesurée plus en aval (Vindimian et Garric 1989; Lindström-Seppa et Oikari, 1990; Adams *et al.*, 1992). Plus récemment, Huuskonen et Lindström-Seppa (1995), en comparant les inductions de la protéine P4501A et de l'activité catalytique EROD mesurées sur des perches exposées à des effluents de pâte à papier non blanchie, concluent à la présence possible de composés inhibiteurs dans ces rejets qui expliquerait les différences d'induction observées selon la méthode de mesure (immunochimique ou enzymatique) employée.

Certaines inhibitions apparentes peuvent être le fait d'une toxicité dont souffre le tissu à partir duquel est réalisée l'analyse (le plus souvent le foie), une fois passé un certain seuil de pollution (Biagianti, ce volume). C'est ce que suggère par exemple l'étude menée par Vindimian *et al.* (1991) qui montre que le taux d'induction le plus faible, observé chez les barbeaux, se rencontre pour les individus capturés à la station la plus proche du rejet, donc les plus exposés aux polluants.

Stratégies actuellement envisagées

Les observations qui précèdent illustrent l'influence possible de nombreux facteurs, autres que des agents polluants, sur le niveau de cytochrome P4501A et l'activité EROD qui lui est associée chez des poissons autochtones. Si dans les cas de forte contamination, l'augmentation de l'induction est en général suffisante pour décrire les situations de pollution, dans des cas plus insidieux (moins contrastés), la variabilité due à ces facteurs, si elle n'est pas maîtrisée, peut sensiblement modifier les diagnostics environnementaux proposés, qu'il s'agisse de l'investigation *in situ* de l'impact de rejets connus, ou de la mise en évidence de zones contaminées par une pollution diffuse.

Le problème du choix d'une référence découle également de cette réflexion.

Le tableau 4 présente les activités utilisées comme référence dans différents travaux. Les variations observées ne sont pas toujours facilement interprétables. Or la fiabilité de la référence conditionne bien évidemment, l'interprétation des résultats en terme d'induction.

Tableau 4: activités EROD pour quelques espèces de cyprinidés.

Espèce	Saison	Sexe	EROD[a]	Auteurs
Barbus barbus	confondues	F	12 (11)	Vindimian *et al.*, 1991
		M	21 (25)	
Barbus barbus	confondues	F	4 (3)	Richert, 1994
		M	7 (9)	
Chondrostoma nasus	printemps		4-13 (1)	Monod *et al.*, 1988
Chondrostoma nasus	confondues	F	16 (15)	Vindimian *et al.*, 1991
		M	53 (45)	
Chondrostoma nasus	confondues	F	6 (5)	Richert, 1994
		M	8 (5)	
Cyprinus carpio			20 (10)	Van der Weiden *et al.*, 1989
Cyprinus carpio			10 (2)	Ueng *et al.*, 1992
Cyprinus carpio	été		5 (1)	Ahokas *et al.*, 1994
Gobio gobio	confondues	F	15 (10)	Richert, 1994
		M	58 (20)	
Leuciscus cephalus	confondues	F	19 (24)	Vindimian *et al.*, 1991
		M	22 (17)	
Leuciscus cephalus	confondues	F	12 (31)	Richert, 1994
		M	13 (24)	
Rutilus rutilus	printemps		7 (1)	Monod *et al.*, 1988
Rutilus rutilus	hiver	F	1,6 (1,6)	Van der Oost *et al.*, 1994

[a] EROD, moyenne (écart type) en pmole/min/mg de protéine.

Cependant, la stratégie d'investigation du milieu basée sur des mesures effectuées chez des poissons naturellement présents dans le système à étudier a fait largement ses preuves (voir plus haut). Il apparaît même que, dans des situations contrastées, la non prise en compte des facteurs "naturels" de variabilité n'empêche pas de conclure à une induction liée à la contamination, compte tenu de l'ampleur de l'induction du cytochrome P4501A pouvant être observée dans ces situations (Collier *et al.*, 1995).

Une alternative aux mesures réalisées sur des individus autochtones soumis à des facteurs de variabilité (autres que la pollution chimique) que l'on peut très difficilement contrôler, est l'emploi d'un système permettant d'encager des poissons sur les sites à étudier. Cette solution a été appliquée dans plusieurs études récentes (Grizzle *et al.*, 1988; Haasch *et al.*, 1993; De Flora *et al.*, 1993; Soimasuo *et al.*, 1995). Elle permet *a priori* de tester la réponse du biomarqueur considéré, sur des lots de poissons historiquement et biologiquement "homogènes", et de s'affranchir des problèmes liés aux déplacements des poissons, en particulier au moment des périodes de frai, et aussi de s'affranchir, dans une certaine mesure, du problème de la référence soulevé plus haut.

Cependant le stress occasionné par le confinement, et les difficultés d'accès à la ressource alimentaire, sont des limites de cette approche à ne pas négliger (Soimasuo *et al.*, 1995). De plus la faisabilité d'une telle stratégie reste à évaluer et à valider dans la perspective d'un suivi régulier d'un biomarqueur tel que l'EROD dans un réseau dans un grand nombre de stations très diverses.

3. Recherche de relations entre l'induction du cytochrome P4501A et des effets au niveau d'autres variables biologiques

Un certain nombres d'éléments amènent à penser que l'induction du cytochrome P4501A pourrait être, dans certaines conditions, le signal précoce d'altérations biologiques plus tangibles, susceptibles de survenir chez les organismes exprimant cette induction (voir Monod: P4501A1 chez les poissons, ce volume). Cette éventualité a été étudiée récemment au sein de plusieurs programmes d'assez grande ampleur visant à évaluer *in situ* l'impact d'effluents d'usines de pâte à papier sur les poissons exposés. Ce type d'effluent a en effet fait l'objet d'attentions particulières après la découverte de leur contamination par des dioxines. Hormis l'induction de l'EROD, un grand nombre de variables biologiques ont été considérées (tableau 5).

Tableau 5

L'ensemble de ces travaux confirment bien l'intérêt de l'EROD comme biomarqueur de la contamination chimique du milieu. Une relation assez nette semble également s'établir entre ce biomarqueur et l'altération de variables biologiques dont la signification toxicologique est *a priori* plus évidente. Ainsi la plupart des études signalent que l'induction de l'EROD va de pair avec la perturbation de paramètres de la reproduction ; en particulier des variations du niveau de stéroïdes sexuels circulants, et parfois même avec une altération de la fécondité. L'ensemble des effets observés pourraient être liés, de près ou de loin, à une perturbation du métabolisme énergétique des individus par les polluants chimiques présents dans les effluents. Ces travaux ont été néanmoins fortement orientés vers la mesure de paramètres relatifs à l'individu. Seules les études de Adams *et al.* (1992) et de Kloepper-Sams *et al.* (1994) ont intégré des variables relatives au niveau populationnel. Mais alors que Adams *et al.* (1992) ont observé de façon concomitante une induction de l'EROD, une modification de la pyramide des âges chez *Lepomis auritus* et une altération de l'index d'intégrité biotique (IBI) relatif aux peuplement piscicole, Kloepper-Sams *et al.* (1994) n'observent pas de corrélation entre une telle induction et un effet sur la pyramide des âges et sur l'indice

d'abondance des espèces qu'ils ont étudiées (les résultats de cette étude pourraient néanmoins avoir été affectés par la survenue de crues exceptionnelles).

Bilan et perspectives

L'ensemble des données existantes tend à montrer que l'augmentation du niveau de cytochrome P4501A chez le poisson est un biomarqueur dont l'utilisation pourrait être envisagée dans deux approches complémentaires de l'étude de la contamination du milieu naturel: d'une part, dans la recherche et la mise en évidence d'une contamination chimique par un certain type de polluants (structure chimique polycyclique et plane) et, d'autre part, dans le cadre de la surveillance de l'état de santé des organismes vivants dans des milieux subissant une influence anthropique. La première approche tend à utiliser cette réponse biologique comme indicateur de contamination du milieu; la seconde vise à l'interpréter comme indicateur précoce d'altération de la biologie des organismes exposés.

Mayer *et al.* (1992) exposent certains critères requis pour le développement d'un biomarqueur et son utilisation sur le terrain. Ce doit être une mesure simple et réalisable sur de nombreux individus, avec une réponse dépendant simplement de la dose et du temps, qui permette une quantification de l'exposition ou de l'effet à partir de la mesure du biomarqueur. Cette mesure doit présenter une bonne sensibilité et une variabilité liée aux facteurs non toxiques (organisme, environnement, méthode) qui soit bien comprise et dans des limites acceptables, et enfin avoir une signification biologique en terme de taille ou de condition de la population.

L'induction du cytochrome P4501A souscrit en grande partie à ces critères. En effet, les données disponibles montrent que ce biomarqueur a connu, depuis plus de 10 ans, une large utilisation dans le suivi de la qualité des milieux et bénéficie de connaissances avancées quant à la compréhension des mécanismes mis en jeu et des causes possibles de sa modulation (voir Monod: P4501A1 chez les poissons, ce volume).

Par ailleurs, la méthodologie de mesure est relativement aisée à mettre en oeuvre. Il faut néanmoins souligner le coût non négligeable des analyses enzymatiques engendré par la qualité du matériel (centrifugeuse, spectrophotomètre, spectrofluorimètre), le temps et la technicité nécessaires à leur réalisation. En outre le dosage de ce biomarqueur n'a pas encore été standardisé, même si les connaissances actuellement acquises permettrait d'y parvenir sans doute assez facilement.

Une standardisation pourrait aussi être obtenue pour l'immunodosage de type ELISA, à condition de disposer de sources commerciales d'anticorps de qualité constante. Les anticorps actuellement employés ont été produits par certains laboratoires en quantités

limitées et pour leurs propres besoins de recherche. La qualité des anticorps polyclonaux utilisés par la plupart des équipes dépend étroitement, d'une part de la source et du niveau de purification du cytochrome P4501A utilisé comme immunogène, et d'autre part du caractère original (non exactement reproductible) de la réaction immunitaire à l'origine de l'obtention d'anticorps polyclonaux. Myers *et al.* (1993) ont démontré le caractère immunogène identique à celui du cytochrome P4501A1 de truite d'un peptide synthétique, et proposent de l'utiliser comme réactif immunisant, permettant ainsi de produire des anticorps de qualité plus constante. L'idéal serait néanmoins d'aller vers la production d'anticorps monoclonaux. Il resterait à savoir si un nombre limité d'anticorps permettrait de détecter les cytochrome P4501A de l'ensemble des espèces susceptibles d'être suivies; dans le cas contraire une telle stratégie devrait sans doute au préalable être évaluée en termes économiques.

Des efforts complémentaires restent néanmoins nécessaires pour mieux cerner l'importance de la variabilité naturelle de l'induction de l'activité EROD, en particulier sur quelques espèces susceptibles d'être aisément et largement échantillonnées en eau douce. L'analyse de cette variabilité naturelle doit être associée à une définition des activités basales (de référence) chez les espèces étudiées.

Dans le cadre de l'utilisation de ce biomarqueur pour la surveillance environnementale, la question de la hiérarchisation de ces facteurs peut se poser: afin de faire la part dans la réponse mesurée de ce qui est dû exclusivement à la contamination, quels sont les facteurs de variabilité qui sont à prendre en compte en priorité, et quelles sont leurs contributions respectives à la réponse? Ainsi la compréhension des résultats de mesure de l'activité, en particulier dans des situations complexes (pollution multi-sources, forte dilution) nécessite de disposer d'informations pertinentes sur la réponse de ce biomarqueur selon un gradient et une typologie des apports polluants. Il est également nécessaire de disposer d'une bonne connaissance de sa variabilité en situation de "référence", si l'on souhaite l'utiliser largement, en particulier dans un contexte de pollutions moins "simples" qu'une comparaison amont aval de site fortement contaminé, ou lorsque les caractéristiques du site ne permettent pas de disposer d'échantillons amont aval homogènes. En vue de la généralisation de l'utilisation de cet outil comme variable biologique de gestion, avec une large utilisation géographique, il apparaît indispensable de disposer de telles informations pour proposer un diagnostic fondé de la contamination du milieu.

L'alternative proposée à travers la méthode d'encagement offre des intérêts indéniables mais devra faire l'objet d'une évaluation rigoureuse (voir plus haut). La durée d'exposition restant en tout état de cause relativement limitée dans de telles conditions, cette méthode ne permet pas d'accéder à des informations nécessitant une intégration

temporelle relativement longue, correspondant à la mise en évidence d'effets à long terme.

Les contraintes et les sources de variations liées à la réalisation de mesure d'EROD ou cytochrome P4501A à partir de poissons vivants capturés ou encagés sur les sites à étudier, ont amené certains auteurs à envisager une stratégie très différente. Son élaboration a pris naissance après que la possibilité de mesurer l'EROD et son induction dans des systèmes cellulaires, cultures primaires et lignées, eut été démontrée et que le concept d'équivalent-dioxine eut été énoncé (voir Monod: P4501A1 chez les poissons, ce volume). Ainsi, Zacharewski *et al.* (1989) ont calculé les équivalents dioxine présents dans des poissons des Grands Lacs en mesurant le taux d'induction de l'activité EROD dans des cellules de la lignée H4II4E exposées à des extraits organiques de ces poissons. Selon la même procédure, Van den Heuvel *et al.* (1994) ont évalué la charge en équivalents-dioxine de poissons exposés à des effluents d'usine de pâte à papier. Lors de cette étude, la réponse du bioessai était corrélée au niveau d'EROD hépatique des poissons. Une étude récente a montrée que l'emploi d'une lignée cellulaire de truite (RTL-W1) pourrait offrir une plus grande sensibilité (Clemons *et al.*, 1994). La mise en oeuvre d'une telle stratégie pourrait viser à rechercher la présence d'équivalents-dioxine dans d'autres compartiments du milieu (eau, sédiments). Ces études permettent d'imaginer des bioessais relativement standardisés, mais la faisabilité d'une telle approche reste néanmoins largement à établir.

Les critères énoncés par Mayers *et al.* (1992) -voir plus haut- abordent le problème de la signification de la réponse fournie par un biomarqueur vis-à-vis d'effets susceptibles de survenir à des niveaux d'organisation biologique supérieurs. Etant entendu que l'induction du cytochrome P4501A n'est pas un effet (éco)toxicologique par lui-même, deux aspects intéressants méritent néanmoins d'être abordés, d'une part en ce qui concerne l'état de santé des organismes sauvages chez lesquels une induction est observée, d'autre part en ce qui concerne la précocité de réponse de ce biomarqueur par rapport à d'autres variables descriptrices de l'état de la santé du milieu.

Un certain nombre d'études mettent en évidence des traits pathologiques au niveau individuel (histopathologie, altération de paramètres de la reproduction et de la croissance) et parfois populationnel chez des poissons dont l'induction du cytochrome P4501A peut être mis en relation avec une contamination chimique du milieu (voir tableau 5). Récemment une bonne concordance entre l'induction de l'activité EROD d'espèces piscicoles autochtones et la dégradation de biocénoses d'invertébrés a pu être mise en évidence (Richert, 1994) sur plusieurs sites, en relation avec la présence d'une contamination chimique toxique. Cependant, ces observations sont toujours réalisées de façon concomitante et n'ont jamais vraiment mis en évidence le caractère précoce, au

sens chronologique, de la réponse de ce biomarqueur par rapport à l'apparition d'autres désordres. Une interprétation un peu rapide de l'expression "early warning system" (Payne *et al.*, 1987) pourrait amener au postulat que l'induction du P4501A est un signal indiquant qu'un processus pathologique (au sens général du terme) aux conséquences écotoxicologiques significatives est enclenché, comme s'il existait un lien de cause à effet entre le déclenchement du signal et le déroulement du processus. En fait, en l'état actuel des connaissances, la position la plus raisonnable serait de considérer l'induction de l'EROD comme biomarqueur de la présence de molécules représentant un danger écotoxicologique (n'oublions pas que l'induction du P4501A est le fait de composés tels que les HAP, les PCB et les dioxines). La compréhension des conditions d'apparition de relations entre l'induction du P4501A et des troubles significatifs de la biologie des organismes représente donc un champ de recherches encore très ouvert.
Une utilisation pertinente de ce biomarqueur repose donc sur sa faisabilité dans le cadre d'études *in situ* et sur une bonne connaissance du "risque" pour les hydrosystèmes: sensibilité vis à vis des polluants inducteurs et danger (capacité reproductive, cancers, hépatotoxicité, etc.) pour les individus et les populations contaminées. Affiner la typologie des réponses en fonction des caractéristiques des milieux étudiés, tant sur le plan écologique que toxique, apparaît essentiel.

Néanmoins, dès à présent, l'induction du cytochrome P4501A représente un biomarqueur qui, associé à d'autres indicateurs (tests de toxicité ambiante, indicateurs écologiques), peut intervenir dans l'élaboration et la mise en oeuvre d'une stratégie de gestion des rejets (comparaison des procédés de traitement, de fabrication etc.) et aider à l'identification des zones à restaurer en priorité.

-ADAMS S.M., CRUMBY W.D., GREELEY M.S., RYON M.G. et SCHILLING E.M., 1992. - Relationships between physiological and fish population responses in a contamined stream. *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 11 , 1549-1557.

-AHOKAS J.T., HOLDWAY D.A., BRENNAN S.E., GOUDEY R.W. et BIBROWSKA H.B., 1994. - MFO activity in carp (*Cyprinus carpio*) exposed to treated pulp and paper mill effluent in lake coleman, Victoria, Australia, in relation to AOX, EOX and muscle PCDD/PCDF. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13, 41-50.

-ANDERSSON T. et FORLIN L., 1992. - Regulation of the cytochrome P450 enzyme system in fish. *Aquat. Toxicol.*, 24, 1-20.

-ANDERSSON T. et KOIVUSAARI U., 1985. - Influence of environmental temperature on the induction of xenobiotic metabolism by β-naphtoflavone in rainbow trout *Salmo gairdneri. Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 80, 43-50.

-ANDERSSON T., FORLIN L., HARDIG J. et LARSSON A., 1988. - Physiological disturbances in fish living in coastal water polluted with bleached kraft pulp mill effluents , *Can. J. Aquat. Sci.*, 45, 1525-1536.

-ANKLEY G.A. et BLAZER V.S., 1988. - Effect of diet on PCB-induced change in xenobiotic metabolism in the liver of channel catfish. *Can J. Fish. Aquat. Sci.*, 45, 132-137.

-CLEMONS J.H., VAN DEN HEUVEL, STEGEMAN J.J., DIXON D.G. ET BOLS N.C., 1994. Comparison of toxic equivalent factors for selected dioxin and furan congeners derived using fish and mammalian liver cell lines. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 51, 1577-1584.

-COLLIER T.K., ANULACION B.F., STEIN J.E., GOKSOYR A. et VARANASI U., 1995. A field evaluation of cytochrome P4501A as a biomarker of contaminant exposure in three species of flatfish. *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol.14 N°1, 143-152.

-COLLIER T.K., CONNOR S.D., EBERHART B.T.L., ANULACION B.F., GOKSOYR A. et VARANASI U., 1992. - Using cytochrome P450 to monitor the aquatic environment: initial results from regional and national surveys. *Mar. Environ. Res.*, 34, 195-199.

-CORMIER S.M. et DANIEL F.B., 1994. - Biomarkers: Taking the science forward. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13, 1011-1012.

-DE FLORA S., VIGANO, D'AGOSTINI F., CAMOIRANO A., BAGNASCO M., BENNICELLI C., MELODIA F. et ARILLO A., 1993. - Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. *Mutation Res.*, Vol. 319, 167-177.

-FORLIN L. et CELANDER M., 1993. - Induction of cytochrome P5401A in teleosts : environmental monitoring in Swedish fresh, brackish and marine waters. *Aquat. Toxicol.*, 26, 41-56.

-FÖRLIN L. et LINDMAN U., 1981. Effects of Clophen A50 and 3-methylcholanthrene on the hepatic mixed function oxydase system in female rainbow trout, *Salmo gairdneri. Comp. Biochem. Physiol.*, 70C, 297-300.

-GAGNON M.M., BUSSIERES D., DODSON J.J. et HODSON P.V., 1995. - White sucker (*Catostomus commersoni*) growth and sexual maturation in pulp mill-contaminated and reference rivers. *Environ. Toxicol. Chem.*, 14, N° 2, 317-327.

-GOKSOYR A. et FORLIN L., 1992. - The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquat. Toxicol.*, 22, 287-312.

-GOKSOYR A. et HUSOY A-M., 1992. - The Cytochrome P450 1A1 response in fish: application of immunodetection in environmental monitoring and toxicological testing. *Mar. Environ. Res.*, 34, 147-150.

-GRIZZLE J.M., HOROWITZ S.A. et STRENGTH D. R., 1988. - Caged fish as monitors of pollution: effects of chlorinated effluent from a wastewater treatment plant. *Water Resour. Bull.*, 24, 951-959.

-HAASCH M.L., PRINCE R., WEIJKSNORA P.J., COOPER K.R. et LECH J.J., 1993. - Caged and wild fish : induction of hepatic cytochrome p-450 (CYP1A1) as an environmental biomonitor. *Environ.Toxicol. Chem.*, 12, 885-895.

-HAUX C. et FÖRLIN L., 1988. - Biochemical methods for detecting effects of contaminants on fish. *Ambio*, 17, 376-380.

-HUUSKONEN S. et LINDSTRÖM-SEPPA P., 1995. - Hepatic cytochrome P4501A and other biotransformation activities in perch (*Perca fluviatilis*): the effects of unbleached pulp mill effluents. *Aquat. Toxicol.*, 31, 27-41.

-JIMENEZ B.D. et STEGEMAN J.J., 1990. - Detoxication enzymes as indicator of environmental stress on fish. *American Fisheries Society Symposium*, 8, 67-79.

-JIMENEZ B.D., OIKARI A., ADAMS S.M., HINTON D.E. et MAC CARTHY J.F., 1990. - Hepatic enzymes as biomarkers : interpreting the effects of environmental, physiological and toxicological variables. *In* MAC CARTHY J.F. et SHUGART L.R. (Eds), *Biomarkers of environmental contamination,* Lewis Publishers, Boca Raton, FL. 123-142.

-KEZIC N., BRITVIC S., PROTIC M., SIMMONS J.E., RIJAVEC M., ZAHN R.K. et KURELEC B., 1983. - Activity of benzo(a)pyrene monooxygenase in fish from the Sava river, Yougoslavia : correlation with pollution. *Sci. Tot. Environ.*, 27, 59-69.

-KLOEPPER-SAMS P.J., SWANSON S.M., MARCHANT T., SCHRYER R. ET OWENS J.W., 1994. - Exposure of fish to biologically treated bleached-kraft effluent. 1.

Biochemical, physiological and pathological assessment of rocky mountain whitefish (*Prosopium williamsoni*) and longnose sucker (*Catostomus catostomus*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 13, 1469-1482.

-LARSSON A., ANDERSON T., FÖRLIN L. et HARDIG J., 1988. - Physiological disturbances in fish exposed to bleached kraft mill effluents. *Water Sci. Technol.* 20, 67-76.

-LINDSTRÖM-SEPPA P. et OIKARI A., 1988. - Hepatic biotransformations in fishes exposed to pulp mill effluents. *Water Sci. Technol.*, 20, 167-170.

-LINDSTRÖM-SEPPA P. et OIKARI A., 1990. - Biotransformation activities of feral fish in waters receiving bleached pulp mill effluents. *Environ. Toxicol. Chem.*, 9, 1415-1424.

-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 (*Chondrostoma 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* HUGGETT R.J., KIMERLE R.A., MEHRLE P.M. et BERGMAN H.L. (Eds), *Biomarkers: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress*, Lewis Publishers, Chelsea, Etats-Unis, 5-86.

-MELANCON J.M., STEVEN E.Y. et LECH J.J., 1987. - Induction of hepatic microsomal monooxygenase activity in fish by exposure to river water. *Environ. Toxicol. Chem.*, 6, 127-135.

-MONOD G. ET VINDIMIAN E., 1991. - Effect of storage conditions and subcellular fractionation of fish liver on cytochrome P-450-dependent enzymatic activities used for the monitoring of water pollution. *Water Res.*, 25, 173-177.

-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., VAN DEN HEUVEL M.R., METNER D.A., LOCKHART W.L. et STEGEMAN D.A., 1993. - Interlaboratory comparison and optimization of hepatic microsomal ethoxyresorufin O-deethylase activity in white sucker (*Catostomus commersoni)* exposed to bleached kraft pulp mill effluent. *Environ. Toxicol.*, 12, 1273-1282.

-MYER C.R., SUTHERLAND L.A., HAASCH M.L. ET LECH J.J., 1993. - Antibodies to a synthetic peptide that react specifically with rainbow trout hepatic cytochrome P450 1A1. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12, 1619-1626.

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

-PAYNE J.F., FANCEY L.L., RAHIMTULA A.D. et PORTER E.L., 1987. - Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Comp. Biochem. Physiol.*, 86C, 233-245.

-RICHERT C., 1994. - Comparaison de marqueurs biochimiques chez les poissons et d'indicateurs écologiques pour le diagnostic *in situ* de la pollution toxique dans les cours d'eau. Thèse de l'Université Claude Bernard-Lyon I, 190pp.

-SINGH H., PAVGI-SINGH S., KEZIC N. et B. KURELEC, 1985. - Xenobiotic and endobiotic induction of mixed function monooxygenase in carp *Cyprinus carpio*. *Sci. Tot. Environ.*, 44, 123-133.

-SOIMASUO R., JOKINEN I., KUKKONEN J. PETÄNEN T. RISTOLA T. ET OIKARI A., 1995. - Biomarker responses along a pollution gradient: effects of pulp and paper mill effluents on caged whitefish. *Aquatic Toxicol.*, 31, 329-346.

-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. Aquat. Sci.*, 44, 1270-1277.

-UENG T.H., UENG Y.F. et PARK S.S., 1992. - Comparative induction of cytochrome P-450-dependent monooxygenases in the livers and gill of tilapia and carp. *Aquat. Toxicol.*,.23, 49-64.

-VAN DEN HEUVEL M.R., MUNKITTRICK K.R., VAN DER KRAK G.J., MCMASTER M.E., PORTT C.B., SERVO M.R. ET DIXON D.G., 1994. - Survey of reciving-water environmental impact associated with discharges from pulp mills. 4. Bioassay-deerived 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxi equivalent concentration in biochemical indicators of impact. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13, 1117-1126.

-VAN DER OOST R., HEIDA H., OPPERHUIZEN A. et VERMEULEN N.P.E., 1991. - Interrelationships between bioaccumulation of organic trace pollutants (PCBs, organochlorine pesticides and PAHs), and MFO-induction in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100C, n°1/2, 43-47.

-VAN DER OOST R., VAN GASTEL L., WORST D., HANRAADS M., SATUMALAY K., VAN SCHOOTEN F., 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, N°4, 801-817.

-VAN DER WEIDEN M.E.J., CELANDER M., SEINEN W., VAN DER BERG M., GOKSOYR A. et FORLIN L., 1993. - Induction of cytochrome P450 1A in fish treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin or chemically contaminated sediment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12, 989-999.

-VAN DER WEIDEN M.E.J., CRAANE L.H.J., EVERS E.H.G., KOOKE R.M.M., OLIES K., SEINEN W. et VAN DER BERG M., 1989. - Bioavailability of PCDDs and PCDFs from bottom sediments and some associated biological effects in the carp . *Chemosphere*, 19/1-6, 1009-1016.

-VIGNIER V., VANDERMEULEN J.H., SINGH J. et MOSSMAN D., 1994. - Interannual mixed function oxidase (MFO) activity in winter flounder (*Pleuronectes americanus)* from a coal tar contaminated estuary. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 51, 1368-1375.

-VINDIMIAN E. et GARRIC J., 1989. - Freshwater fish cytochrome P450 dependent enzymatic activities : a chemical pollution indicator.

Tableau 1: Induction de l'activité EROD mesurée sur quelques espèces de poissons d'eau douce exposées à des contaminations chimiques *in situ*.

Sites	Contamination identifiée	Période d'échantillonnage	Espèce	EROD[a] Sites références	EROD[a] Sites contaminés	Induction	Auteurs
Lac Coleman (Australie)	Effluent traité (pâte à papier) $AOX_{(eau)}$, $EOX_{(sediment)}$, $PCDD/TCDD_{(muscle)}$	août	*Cyprinus carpio* (carpe commune, cyprinidés) mâles et femelles	$4{,}6\ 10^3$ à $6\ 10^3$	$17\ 10^3$ à $31\ 10^3$	oui (x 3 à 6)	Ahokas *et al.*, 1994
Lac Kallavesi (Finlande)	Effluent traité de pâte à papier non blanchi	janvier-février, avril, juin, septembre-octobre	*Perca fluviatilis*, (perche, percidés) mâles et femelles	27 (hiver) à 16 (été)	36 (hiver) à 45 (été)	(x 1.9 à 2.9)	Huuskonnen *et al.*, 1995
Lac Saima Finlande	Effluent traité de pâte à papier blanchi au chlore	septembre, octobre (post frai)	*Perca fluviatilis*, *Rutilus rutilus*, *Abramis brama* femelles	3-16 0.3-0.8 7.7	12-43 3-24 37-50	oui	Lindström-Seppa et Oikari., 1990
Lacs Gaasperplas et Nieuwe Meer (Hollande)	HAPs, PCBs, OCs des sédiments et dans les poissons	décembre	*Rutilus rutilus* (gardon, cyprinidés) femelles	1.3	1.6	non	Van der Oost *et al.*, 1994
Fleuve Rhône (France)	PCBs dans les poissons	mars, juin, novembre	*Chondrostoma nasus* (hotu, cyprinidés) mâles et femelles	6-60 (mâles) 3-60 (femelles)	20-100(mâles) 10-110 (femelles)	oui (x 2 à 5)	Masfaraud *et al.*, 1990
Fleuve Rhône (France)	PCBs dans les poissons	printemps	*Chondrostoma nasus*, (hotu, cyprinidés), *Rutilus rutilus* (gardon, cyprinidés), *Thymallus thymallus* (ombre commun)	4-13 7 76-136	36(+/-1) 52(+/-6) 480 (+/-73)	oui (x 6 à 9)	Monod *et al.*, 1988
Rivière Durance (France)	Effluent chimique (contaminants organochlorés, dont γ HCH, DDT, PCBs dans bryophytes)	octobre, février, mai	*Chondrostoma nasus*, *Leuciscus cephalus*, *Barbus barbus* mâles et femelles (cyprinidés)	30-48 12-29 11-27		oui (x 6 à 20)	Vindimian *et al.*, 1991

[a] : pmol/min/mg de protéine.

Tableau 2: Relations concentrations-réponse observées in situ (établies à partir des données disponibles dans les articles cités en référence).

Inducteur	Compartiment	Espèce	Concentration	Unité	EROD (pmol/min/mg)	Corrélation EROD-dose (r^2)	Auteurs
PCB	muscle	*Chondrostoma nasus* *Rutilus rutilus*	0,9-4,5 1.6-5.3	mg/kg frais	4-36 7-52	0,88	Monod *et al.*, 1988
AOX	eau	*Cyprinus carpio*	300-400	µg/l	5000-35000	0,93	Ahokas *et al.*, 1994
TCDD	muscle	*Cyprinus carpio*	1-4	pg/g sec	5000-35000	0,88	
HAP	sédiment	*Pleuronectes americanus*	7-200	µg/g sec	300-2000	0,98	Vignier *et al.*, 1994
PCB, HAP, OC	sédiment	*Anguilla anguilla*	0.1-0.9 25-128 0.05-0.2	µg/g carbone organique	128-238	-	Van der Oost *et al.*, 1991
PCB, HAP, OC	muscle	*Anguilla anguilla*	2-13 2.4-1.8 1.4-8	µg/g lipides	128-238	corrélation positive	
PCB, HAP, OC	muscle	*Rutilus rutilus*	1.4-5.7 3.3-1.9 0.7-3.8	µg/g lipides	0.6-3.5	corrélation positive	
PCB, HAP, OC	sédiment	*Rutilus rutilus*	0.1-0.8 15-80 0.08-0.4	µg/g carbone organique	1.6-2.0	pas d'induction EROD significative	Van der Oost *et al.*, 1994
PCB, HAP, OC	muscle	*Rutilus rutilus*	2.5-7.0 4.0-3.0 0.5-1.3	µg/g lipides	1.6-2.0	pas d'induction EROD significative	

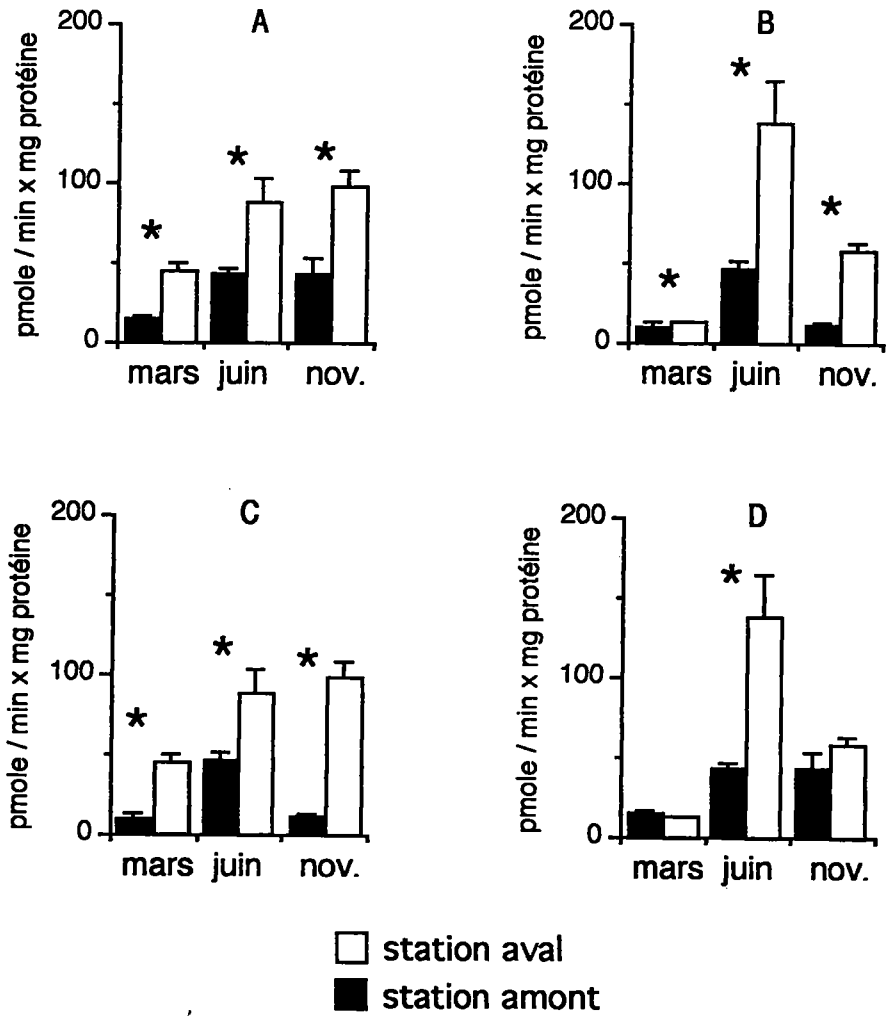


Figure 1. Activité EROD hépatique chez des hotus (*Chondrostoma nasus*) capturés en amont (station de référence) et en aval d'une usine d'élimination des PCBs durant l'année 1988 (d'après Masfaraud *et al.*, 1990).
A. Les individus comparés sont de sexe male
B. Les individus comparés sont de sexe femelle
C. Les individus comparés sont de sexe male en aval et femelle en amont
D. Les individus comparés sont de sexe femelle en aval et male en amont
* : différence amont/aval statistiquement significative.

Tableau 5: Liste de travaux sur l'induction de l'activité EROD hépatique en liaison avec la contamination chimique du milieu (effluents d'usines de pâte à papier) et l'altération d'autres variables biologiques chez des poissons d'eau douce.

Espèce et variables biologiques mesurées	Relation EROD/pollution chimique	Relation EROD/autres variables biologiques	Références
Lepomis auritus stéroïdes sexuels - intégrité ADN - RHS - morphométrie - croissance - fécondité - pyramide âges - Indice Intégrité Biotique -	+ (aval effluents)	+	Adams *et al.* (1992)
Perca fluviatilis stéroïdes sexuels - glycogène hépatique - ac. ascorbique hépatique et musculaire - balance osmotique - hématologie -RGS - RHS -	+ (aval effluens)	+	Andersson *et al.* (1988)
Catostomus commersoni stéroïdes sexuels - RGS - morphométrie - croissance - fécondité - âge première maturité -	+ (phénols, gaiacols, ...)	+	Gagnon *et al.* (1995)
Catostomus catastomus et *Prosopium williamsoni* hématologie - stéroïdes sexuels - RHS - RGS - histologie - morphométrie - croissance - âge première maturité - fécondité - pyramide âges - abondance -	+ (dioxines, furanes)	-	Kloepper-Sams *et al.* (1994)
Catostomus commersoni stéroïdes sexuels - spermogramme - pouvoir fertilisant sperme - RGS - fécondité - morphométrie - croissance - âge première maturité -	+ (aval effluents)	+	Munkittrick *et al.* (1994)
Catostomus commersoni stéroïdes sexuels - RHS - RGS - morphométrie - croissance -	+ (dioxines, furanes)	+	Munkittrick *et al.* (1994)

Article 2

FLAMMARION P. et J. GARRIC (1996) Qualité des milieux aquatiques continentaux : intérêts de l'utilisation d'un marqueur biochimique chez le poisson. *La Houille Blanche*, N°5, 19-24.

Qualité des milieux aquatiques continentaux : intérêts de l'utilisation d'un marqueur biochimique chez le poisson

P. Flammarion et J. Garric

Laboratoire d'écotoxicologie. Cemagref de Lyon

I ■ INTRODUCTION

La multiplication des activités humaines a entraîné la dispersion massive de micropolluants divers dans l'environnement. Ce dernier a ainsi hérité de métaux. pesticides. hydrocarbures. phtalates. détergents... tous potentiellement dangereux pour les organismes vivants des écosystèmes aquatiques.

Lorsque l'organisme ne peut pas ou ne peut plus se défendre. des effets toxiques variés se développent en fonction du temps d'exposition. de la toxicité et de la concentration des polluants dans le milieu. Mais auparavant tout commence au sein de l'organisme à un niveau cellulaire ou subcellulaire entre le composé toxique et les composants fonctionnels de la cellule : enzymes. métabolites. membranes... où ces polluants vont être pris en charge par les processus naturels de défense de l'organisme : biotransformation. élimination. bioaccumulation.

Pour évaluer la présence et l'impact de polluants dans les écosystèmes. il est ainsi possible de mesurer d'une part les effets sur les populations et communautés et d'autre part les réactions de défense des individus. La mesure de ces variables biologiques vient en complément des mesures physico-chimiques traditionnelles.

II ■ BIOINDICATEURS ET BIOMARQUEURS

Les **indicateurs biocénotiques** ou écologiques sont des mesures. de l'état de santé de l'écosystème. au niveau des populations ou des communautés d'organismes. Cette approche est justifiée par le fait que les populations se développent dans les milieux qui leur sont favorables. Lorsque les conditions écologiques sont altérées. l'organisation naturelle des communautés aquatiques est perturbée (baisse de la diversité et/ou de l'abondance).

Le terme de **biomarqueur** désigne quant à lui la mesure d'une perturbation au niveau cellulaire et tissulaire des organismes (indicateurs biochimiques. physiologiques ou histologiques d'exposition d'un organisme à des xénobiotiques [1]).

En particulier. **les biomarqueurs biochimiques** sont des mesures de réactions biologiques impliquées dans les phases précoces de l'intoxication : l'observation de changements biochimiques permet de détecter une perturbation chez les organismes avant l'apparition de signes pathologiques irréversibles (dégâts tissulaires. nécroses. tumeurs...) et avant l'affaiblissement des populations (taux de croissance.

Continental aquatic environment quality : use of fish biochemical markers

Biological assessment is useful in addition to conventional chemical mesures in order to monitor the water quality. Biochemical markers are early warning systems of the exposition of organisms to pollutants. Among them. the induction of the fish EROD activity enables the detection of specific compounds PAHs, PCBs, dioxines.

EROD induction was evaluated for three cyprinids species in two French river sites : Durance and Moselle. In the river Durance, the closer to a chemical plant the sampling site was. the higher the measured EROD induction. In the river Moselle, the fish showed a significant induced EROD activity after industrial effluent discharges. In both cases the measure was species dependent.

Although the EROD activity seems a fitted tool to assess the water quality. complementary studies are necessary to understand the effects of biotic and abiotic variables on the results.

Tableau 1. — Avantages et inconvénients des différentes méthodes d'évaluation in situ présentées (d'après [3]).

	Avantages	Inconvénients
Analyses chimiques	information spécifique, quantitative, sensible	méconnaissance des effets toxiques et des interactions entre composés, méconnaissance de la signification biologique des informations obtenues
Marqueurs biochimiques	spécificité, signification toxicologique, alarme précoce	signification écologique imprécise
Indicateurs écologiques	signification écologique élevée, mise en évidence d'un stress ou d'une perturbation	signalisation tardive d'impacts toxiques, indication peu spécifique d'un type de pollution

fécondité). Les biomarqueurs biochimiques les plus couramment utilisés sont [2] : les métallothionéines dont la teneur dans les cellules est liée à la présence de certains métaux dans le milieu, les protéines de stress, les marqueurs de stress oxydatif (atteintes radicalaires de certaines macromolécules ou de certaines fonctions cellulaires), l'activité acétylcholinestérase (AChE) inhibée par la présence de certains contaminants (métaux lourds et pesticides), les monooxygénases à cytochromes P450 liées à la présence de HAP, dioxines, PCB, les enzymes de conjugaison (ex : Glutathione S-transferase : GST) impliquées dans l'excrétion de métabolites toxiques.

Les mesures de ces biomarqueurs peuvent être réalisées sur des organismes test de manière standardisée pour permettre une stabilité satisfaisante des mesures mais cela soulève la question de la représentativité vis-à-vis des systèmes écologiques naturels (Blandin, 1986). En effet, les paramètres du milieu et leur variabilité d'une part, et la diversité génétique des espèces, d'autre part, ne sont pas pris en compte par ce type d'expérimentation. L'autre approche est celle de la mesure *in situ* où les organismes intègrent les modifications du milieu.

C'est dans ce cadre que nous développerons plus en détail le biomarqueur EROD et son utilisation concrète *in situ*.

III ■ LE BIOMARQUEUR EROD

Suite à une contamination du milieu aquatique, les polluants peuvent pénétrer à l'intérieur des organismes par voie directe (exposition) et/ou par voie alimentaire, se propager, s'accumuler au niveau de différents tissus et exercer leur toxicité sur l'organisme cible. Cependant, un système de détoxication des xénobiotiques s'est mis en place au cours de l'évolution : il transforme les xénobiotiques bioaccumulables, en général hydrophobes, en produits hydrophiles qui peuvent être éliminés plus facilement dans l'urine et la bile.

Dans une première phase de la biotransformation interviennent des complexes multienzymatiques : les monooxygénases à cytochrome P450. Une deuxième phase augmente encore la solubilité des produits qui sont alors rapidement éliminés par l'organisme.

Chez le poisson, les activités de biotransformation de phase I peuvent être quantifiées en particulier par la mesure de l'activité Ethoxy-Resorufine O-deethylasique (EROD) dans le foie, mais de nombreuses autres mesures d'activités enzymatiques sont citées dans la littérature scientifique ([4]...).

Cette activité EROD est augmentée (on parle d'induction) par l'exposition à un certain nombre de molécules chimiques. Cette classe d'inducteurs regroupe des molécules généralement très toxiques mais aussi stables et lipophiles, qui s'accumulent facilement dans les organismes :

— *des composés hydrocarbures aromatiques polycycliques ou HAPs* comme le 3-méthylcholanthrène, le benzo(a)pyrène, le benzo(a)anthracène ;

— *des hydrocarbures aromatiques halogénés* très toxiques tels que la 2.3.7.8-tétrachlorodibenzo(p)dioxine ou TCDD. On les trouve à l'état de traces dans les préparations commerciales de substances chlorées (pesticides...) et dans certains effluents de papeteries [5] ;

— *des polychlorobiphényls* ou PCBs plans [6] ; tels que les isomères 3, 3'4,4'-tétrachlorobiphényl ou PCB 77 et 2,3' 4,4'5-pentachlorobiphényl ou PCB 118 ;

— des inductions ont été observées pour des *effluents complexes* (industriels et municipaux)...

Outre la spécificité à une catégorie de xénobiotiques, l'induction présente les trois caractéristiques suivantes : rapidité (délai de 2 à 5 jours après l'exposition), concentration-dépendance, réversibilité.

Les activités monooxygénases peuvent à la fois réduire la toxicité des polluants (c'est leur rôle principal) mais aussi augmenter leurs effets chroniques ou cancérigènes lorsque c'est le composé biotransformé qui présente ces dangers pour l'organisme. Dans ce cas une induction des activités monooxygénases est prédictive d'un risque réel pour les organismes. Dans tous les autres cas elle indique uniquement l'exposition des organismes à des polluants.

Chez les poissons exposés aux polluants chimiques, le système de biotransformation est sollicité et les activités enzymatiques de détoxication sont induites. Mais indépendamment de toute pollution, les activités biochimiques, dont l'EROD, sont soumises à l'influence de nombreux autres facteurs dont il faut connaître avec précision les influences afin d'interpréter correctement les niveaux du biomarqueur EROD mesuré sur des poissons prélevés dans le milieu.

On observe généralement des niveaux d'activités monooxygénases différents selon les espèces, le sexe et la maturité sexuelle des poissons (les mâles présentent des activités légèrement supérieures aux femelles ([8] chez *O. mykiss* ; [9] chez *Chondrostoma nasus*). La température du

Tableau 2. — Principaux facteurs modulateurs naturels (d'après [7]).

Espèce	Age
Lignée	Etat reproductif
Sexe	Température

milieu est également un facteur important dans la mesure où elle gouverne la température interne des poissons et leur maturation sexuelle au long de l'année. A ces facteurs environnementaux naturels vient s'ajouter la pollution chimique.

Afin d'atténuer les effets des facteurs de modulation sur le diagnostic, il est possible de calculer un taux d'induction qui est défini comme le rapport de l'activité EROD de l'échantillon considéré sur l'activité moyenne, dite de référence, mesurée sur les poissons de même espèce, de même sexe et pêchés à la même saison sur la station de référence.

L'utilisation d'activités monooxygénases pour identifier les zones de pollutions chimiques dans l'environnement aquatique s'est développée au cours des vingt dernières années dès 1976 [4]. Des taux élevés dans les foies de poisson ont été observés au niveau des zones affectées par des déversements de pétrole [10], [4] ou par des effluents d'usines (ex. : papeteries, usines d'incinération de PCBs) [11], [12].

Un certain nombre d'études ont concerné les zones côtières américaines [13] ou françaises [14], [15], [16]. En France, après plusieurs années d'expérimentation, l'activité EROD est actuellement envisagée comme outil de biosurveillance des côtes françaises au sein du Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin, le RNO [17].

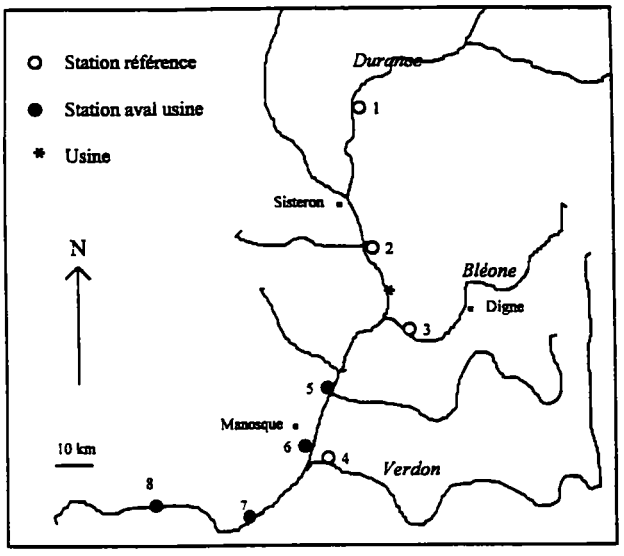
IV ■ EXEMPLES D'UTILISATION DE L'EROD POUR LA SURVEILLANCE DES EAUX DOUCES

4.1 La Durance

Le principal pôle industriel de la moyenne Durance est une usine chimique installée à Saint-Auban. Cette usine est une importante unité de production qui produit essentiellement du chlore et du chlorure de vinyle mais aussi du trichloréthylène, du trichloréthane, de l'acide monochloracétique et du polychlorure de vinyle.

Les résultats des nombreuses analyses effectuées en 1991 et 1992 au niveau de l'eau et des matières en suspension mettent en évidence la présence de certains éléments toxiques comme les métaux, les solvants chlorés produits par l'usine de Saint-Auban mais aussi des pesticides précis : l'hexachlorobenzène, les congénères α, β et γ d'hexachlorocyclohexane (HCH).

La mesure de l'activité EROD a été utilisée en 1991 afin de caractériser la qualité des milieux aquatiques le long de la Durance [3] et compléter une étude similaire réalisée



1. Carte de la Durance et des stations de pêche.

auparavant [18]. Huit stations ont été choisies pour cette étude :

— quatre stations de « référence » : sur la Durance, en amont de l'usine de Saint-Auban (stations 1 et 2), et sur deux affluents de la Durance, la Bléone et le Verdon (stations 3 et 4) ;

— quatre stations sur la Durance en aval de l'usine : Brillanne, Manosque, Peyrolles et Roque d'Anthéron (respectivement stations 5, 6, 7 et 8).

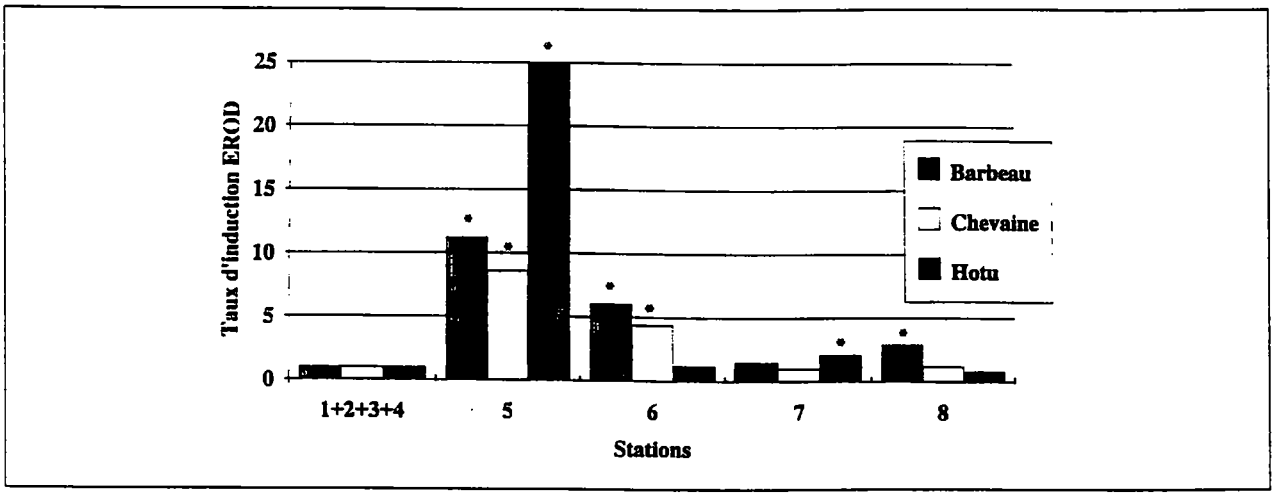
Trois espèces de Cyprinidés ont été retenues en raison de leur abondance dans la Durance, la Bléone et le Verdon, et ont été capturées lors de pêches à l'électricité : *Barbus barbus* (le barbeau commun), *Leuciscus cephalus* (le chevaine) et *Chondrostoma nasus* (le hotu).

L'activité EROD, pour chaque individu, est ensuite exprimée en taux d'induction EROD calculé par rapport à l'activité de référence (*fig. 2*).

L'analyse statistique globale met en évidence un effet station significatif (Kruskal et Wallis, $p = 0,000$) et l'analyse statistique détaillée montre que chaque station à l'aval de l'usine se distingue des autres. Globalement, un gradient décroissant d'induction est visible au fur et à mesure que l'on s'éloigne de l'usine. L'induction est maximale pour les trois espèces à la station 5, la plus proche de l'usine. Ensuite les profils d'induction par espèce se différencient.

Le barbeau est induit de façon significative même à la station 8, la plus éloignée de l'usine contrairement aux deux autres espèces. La même remarque peut être faite au sujet du hotu pour la station 7. En revanche les hotus sont les seuls poissons non induits à la station 6. L'espèce chevaine ne présente plus d'induction dès la station 7.

Les PCBs, potentiels responsables de l'induction, ont été recherchés dans le foie des poissons au printemps 1993. Il est apparu qu'aucun des 20 poissons pêchés aux stations 2 et 3 n'a accumulé dans son foie de PCBs en quantité détectable. Ce n'est pas le cas des poissons pêchés en aval de l'usine (stations 5 et 6) dont seulement une minorité ne présentent pas de PCBs. Par ailleurs, la Brillanne (station 5) affiche une teneur en PCB moyenne



2. Taux d'induction EROD moyen annuel par espèce et par station sur la Durance en 1991 [3].
Les étoiles indiquent des différences significatives par rapport aux stations de référence ($p < 05$).

plus élevée que Manosque (station 6) qui suit donc l'évolution de l'induction (respectivement 1 056 et 586 µg PCB/kg de poids sec).

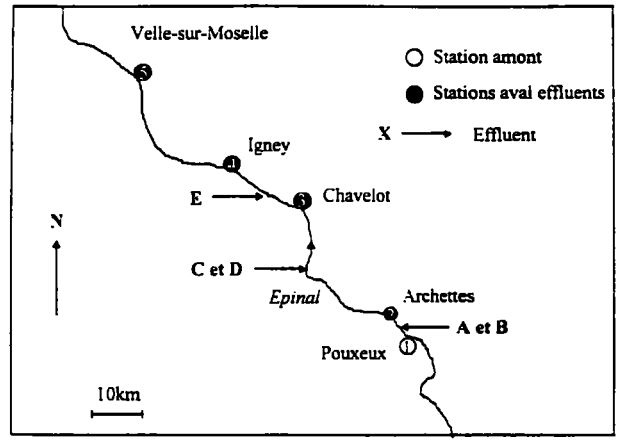
Il est intéressant de constater que les barbeaux présentent dans leur foie, des teneurs en PCBs bien supérieures à celles dosées dans les chevaines. Leur comportement benthique explique certainement leur forte contamination, les sédiments étant en principe fixateurs de micropolluants.

L'étude de 1991 a ainsi permis de mettre en évidence un impact des rejets d'une usine chimique de la Durance sur l'activité biochimique EROD dans le foie des poissons pêchés à 20 km et plus. De fortes inductions sont constatées chez les trois espèces de Cyprinidés pêchées. Le taux d'induction se révèle lié à la teneur en PCBs totaux dosée dans le foie de chaque poisson.

4.2 La Moselle

Une étude réalisée en 1992-1993 sur la Moselle, avec le soutien de l'Agence de l'eau Rhin-Meuse, a eu pour objectifs d'évaluer l'écotoxicité des effluents les plus importants du secteur (amont et aval d'Epinal) et leur impact sur les populations piscicoles en place [19].

Des prélèvements de sédiments ont été réalisés en mai 1995 sur 5 des stations étudiées. Ils révèlent la présence de HAPs sur toutes les stations prospectées. En ce qui concerne



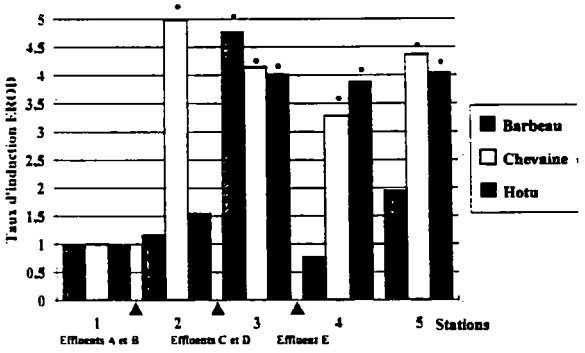
3. Carte de la Moselle, des stations de pêche et de rejets industriels majeurs.

Tableau 3. — Présentation des principaux effluents rejetés sur le secteur étudié de la Moselle.

Code	Type	Caractéristiques
rejet A	Papeterie	Pas de blanchiment au chlore Pas de traitement des eaux résiduaires
rejet B	Papeterie	Pas de blanchiment au chlore Utilisation de colorants Epuration primaire
rejet C	Station d'épuration	Limite de norme
rejet D	Usine de production de pâte à papier	Pas de blanchiment au chlore Epuration primaire et secondaire
rejet E	Teinturerie	Utilisation de colorants Décantation

les métaux, le zinc, le plomb, le chrome, le mercure et le cuivre sont détectés à des concentrations supérieures aux concentrations de référence. Parmi les 17 pesticides organochlorés recherchés, six seulement ont été détectés. En ce qui concerne les PCBs, quatre congénères sur les sept recherchés sont détectés, dont deux présents à toutes les stations (PCBs 138 et 153).

Les trois mêmes espèces de Cyprinidés ont été prélevées en raison de leur abondance sur l'ensemble des stations étudiées : le barbeau, le chevaine et le hotu.



4. Taux d'induction EROD moyen annuel par espèce et par station sur la Moselle en 1992 [3].
Les étoiles indiquent des différences significatives par rapport à la station 1 ($p < 05$.

Si on compare statistiquement les taux d'induction moyens calculés par station, toutes espèces confondues, un effet station est mis en évidence ($p < 0.01$) et l'analyse statistique de comparaison de moyennes deux à deux (Mann et Whitney) permet de discriminer deux groupes de stations : la station située en amont de tous les rejets étudiés, Pouxeux (station 1), est statistiquement différente des trois stations situées en aval d'Epinal, Chavelot, Igney et Velle-sur-Moselle (respectivement 3, 4 et 5).

Les taux d'induction moyens, calculés à chaque station et pour chaque espèce, sont présentés sous formes d'histogrammes dans la *figure 4* qui met en évidence des variations interspécifiques du taux d'induction en fonction des stations.

L'espèce chevaine présente des inductions significatives dès la station 2 et jusqu'à la dernière station. Les hotus et les barbeaux, contrairement aux chevaines, ne présentent pas d'induction d'activité EROD en aval des rejets A et B, station 2. L'activité des hotus est induite sur les stations 3, 4 et 5 alors que les barbeaux n'affichent une induction significative qu'à la station 3.

Quelle que soit l'espèce considérée, à l'aval d'Epinal (station 3) on peut considérer une induction particulièrement marquée. Les poissons sont induits jusqu'à la station le plus à l'aval à une trentaine de kilomètres du dernier rejet E alors que nos informations ne font pas état d'autre rejet important à ce niveau.

Des études parallèles ont été réalisées en laboratoire sur des truites immatures exposées durant 96 heures à des gradients de concentrations pour chacun des 5 effluents. Les effets mesurés en laboratoire s'accordent avec les réponses d'induction EROD obtenues *in situ* en aval des rejets étudiés. Cependant, hormis pour le rejet E, nous n'observons pas de relation dose-effet simple.

Le rejet E (teinturerie) se distingue des autres par un pouvoir inducteur plus élevé puisque l'induction est significative dès la plus faible concentration d'essai (0,5 %). L'effet inducteur de cet effluent pourrait être lié en partie, à la présence de molécules colorantes de structure proche de substances telles que le 3,3',4,4-tétrachloro-azobenzène, décrites comme inductrices des P450IA chez le rat [20].

En définitive, sur le secteur étudié, la Moselle reçoit 5 effluents principaux dont les potentiels toxiques et les capacités à induire l'activité EROD des poissons ont été mis en évidence au cours d'expériences en laboratoire. *In situ*, le biomarqueur EROD se montre suffisamment sensible pour signaler par une induction, cohérente avec l'étude de laboratoire, une contamination des poissons accrue en aval des premiers rejets étudiés et jusqu'à la dernière station.

V ■ CONCLUSION

Sur la Durance, l'augmentation de l'activité EROD a traduit une influence des rejets chimiques de l'usine sur les poissons pêchés jusqu'à 30 km en aval. Sur la Moselle, l'utilisation de l'activité EROD *in situ*, comme en laboratoire, a permis de mettre en évidence l'impact de plusieurs effluents industriels et urbains sur la qualité de l'eau.

Nos résultats confirment ainsi la sensibilité du biomarqueur EROD puisque sa réponse est modulée de façon significative en fonction du niveau de contamination.

Parallèlement aux mesures d'induction EROD, étaient effectués des examens des peuplements d'invertébrés au cours des deux études. On a constaté que le diagnostic donné par le biomarqueur EROD était cohérent avec celui donné par l'étude des invertébrés [3].

Pour l'utilisation *in situ* du biomarqueur EROD, il est très important de bien choisir la ou les stations de référence car ce choix détermine la mise en évidence d'un impact. Si l'étude consiste à mettre en évidence l'impact spécifique d'un rejet précis (ce qui est généralement le cas), la meilleure situation est alors en amont de ce rejet, en veillant à ce qu'aucune autre source polluante n'intervienne entre cette station de référence et la station située en aval du rejet (en pratique, ceci est difficile à obtenir).

Par ailleurs, afin de supprimer les difficultés d'échantillonnage sur certains sites, plusieurs études ont utilisé des poissons d'élevage placés dans des cages et disposés au niveau de stations prédéterminées. Cette technique résout le problème de la mobilité des poissons sur le site. Le marqueur biochimique procure ainsi une information plus précise du niveau de contamination à chaque station, ce qui favorise l'identification des sources de polluants. Elle permet d'utiliser une espèce sentinelle qui peut donner une information objective sur la qualité de l'eau, en ce sens que les poissons introduits dans le milieu ne présentent pas les phénomènes d'adaptation à la pollution ambiante que peuvent présenter les espèces locales [5].

Enfin, le dosage de l'activité EROD nécessite des précautions lors du prélèvement des foies et de sa conservation sur le terrain [7]. C'est pourquoi, la technique d'immunodétection de la teneur en P450IA1 est certainement une méthode qui permettra un échantillonnage plus facile et une détection automatisée [21], [7], [2]. Cette méthode immunochimique

confirme mais également complète l'information apportée de façon précoce par les activités catalytiques sur le niveau d'induction du P450IA dans le poisson. En particulier, l'immunodétection permet de détecter les enzymes P450IA dont l'activité catalytique est inhibée par un polluant ou qui ont perdu leur capacité catalytique. Elle se révèle donc d'un intérêt considérable pour l'interprétation et la compréhension des comportements de faible ou « non induction » d'activité EROD.

Actuellement, les gestionnaires soucieux de l'environnement disposent d'une palette d'outils. Les méthodes de bioévaluation de la qualité de l'eau sont, en effet, variées et interviennent à différents niveaux d'organisation biologique. Elles apportent des informations différentes et souvent complémentaires. Etant donné l'intérêt de la mesure de l'activité EROD et pour favoriser son développement, il paraît indispensable d'engager dès à présent, des études de standardisation et d'intercalibration de la méthode [7]. Cette mesure est actuellement proposée à titre expérimental pour 4 ans dans le Réseau National d'Observation de la qualité des côtes françaises. En eau douce, les Finlandais et les Suédois valident actuellement l'utilisation de l'activité EROD pour la surveillance des effluents de papeteries.

Bibliographie

[1] HUGGETT R.J., KIMERLE R.A., MEHRLE P.M. & BERGMAN H.L. (1989). — « Biomarkers : biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress ». SETAC Special Publications Series. Lewis Publishers, Chelsea, US, 347 p.

[2] VINDIMIAN E. & GARRIC J. (1992). — Bioessais et bioindicateurs de toxicité dans le milieu naturel. Ministère de l'Environnement. Etude inter agences n°17-61 p.

[3] RICHERT C. (1994). — Comparaison de marqueurs biochimiques chez les poissons et d'indicateurs écologiques pour le diagnostic *in situ* de la pollution toxique dans les cours d'eau. Thèse de l'Université Claude Bernard-Lyon I, 190 pp.

[4] PAYNE J.F. (1976). — Field evaluation of benzopyrene hydroxylase induction as a monitor for marine petroleum pollution. Science, 191, 945-946.

[5] LINDSTROM-SEPPA P. & OIKARI A. (1990). — Biotransformation and other toxicological and physiological responses in rainbow trout (*Salmo gairdneri Richardson*) caged in a lake receiving effluents of pulp and paper industry. Aquatic Toxicology, **16**, 187-204.

[6] MELANCON M.J., ELCOMBE C.R., VODICNIK M.J. & LECH J.J. (1981). — Induction of cytochromes P-450 and mixed function oxidase activity by polychlorinated biphenyls and β-naphtoflavone in carp, Cyprinus carpio. Comp. Biochem. Physiol., **69C**, 219-226.

[7] GOKSØYR A. & FORLIN L. (1992). — The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. Aquatic Toxicology, **22**, 287-312.

[8] FORLIN L. & 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.

[9] MASFARAUD J.F., MONOD G. & 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 (Chondrostoma nasus) from the river Rhône. The Science of the Total Environment, **97/98**, 729-738.

[10] PAYNE J.F. & PENROSE W.R. (1975). — Induction of aryl hydrocarbon (benzo(a)pyrene) hydroxylase in fish by petroleum. Bull. Environ. Contam. Toxicol., **14/1**, 112-116.

[11] MONOD G., DEVAUX A. & RIVIERE J.L. (1988). — Effects of chemical pollution on the activities of hepatic xenobiotic metabolizing enzymes in fish from the river Rhône. Comp. Biochem. Physiol., **88C/1**, 83-89.

[12] LINDSTRÖM-SEPPÄ P. & OIKARI A. (1988). — Hepatic xenobiotic biotransformation in fishes exposed to pulpmill effluents. Wat. Sci. Tech. **20/2**, 167-170.

[13] STEGEMAN J.J., WOODIN B.R. & GOKSØYR A. (1988). — Apparent cytochrome P-450 induction as an indication of exposure to chemicals in the flounder Platichthys flesus. Mar. Ecol. Prog. Ser., **46**, 55-60.

[14] LAFAURIE M., GIUDICELLI J., CARRIERE S., LEMAIRE P., MATHIEU A. & NEGRE Y. (1989). — Pollutant biotransformation in marine teleost fish : Use in environmental health evaluation. Advances In Applied Biotechnology Series, **5**, 141-152.

[15] GALGANI F., BOCQUENE G., LUCON M., GRZEBYK D., LETROUIT F. & CLAISSE D. (1991). — EROD measurements in fish from the northwest part of France. Marine Pollution Bulletin. **22/10**, 494-500.

[16] NARBONNE J.F., GARRIGUES P., RIBERA D., RAOUX C., MATHIEU A., LEMAIRE P., SALAUN J.P. & 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/1-2**, 37-42.

[17] CLAISSE D., JOANNY M. & QUINTIN J.Y. (1992). — Le réseau national d'observation de la qualité du milieu marin (RNO). Analysis Magazine, **20/6**, 19-23.

[18] VINDIMIAN E., NAMOUR P., MIGEON B. & GARRIC J. (1991). — *In situ* pollution induced cytochrome P-450 activity of freshwater fish : barbel (*Barbus barbus*), chub (*Leuciscus cephalus*) and nase (*Chondrostoma nasus*). Aquatic Toxicology, **21**, 255-266.

[19] GARRIC J., BRAY M., MIGEON B., VOLLAT B. & RICHERT C. (1994). — Evaluation de l'écotoxicité de rejets industriels et urbains et de la contamination du milieu récepteur. rapport Cemagref, 33 p.

[20] BUNCE N.J., CHOONG D.K.M., LANDERS J.P. & ZACHAREWSKI T.R. (1989). — Competitive binding of chlorinated azobenzenes to the Ah receptor protein. Environ. Toxicol. Chem., **8**, 25-30.

[21] GOKSØYR A. (1991). — A semi-quantitative cytochrome P450IA1 ELISA : a simple method for studying the monooxygenase induction response in environmental monitoring and ecotoxicological testing of fish. The Science of the TOTAL ENVIRONMENT, **101**, 255-262.

[22] LINDSTRÖM-SEPPÄ P. & OIKARI A. (1989). — Biotransformation and other physiological responses in whitefish caged in a lake receiving pulp and paper mill effluents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **18**, 191-203.

[23] LINDSTRÖM-SEPPÄ (1990). — Biotransformation in fish : Monitoring inland water pollution caused by pulp and paper mill effluents. *Publications of the university of Kuopio, Natural Sciences, original Reports*, 69 pp.

[24] STEGEMAN J.J. (1981). — Polynuclear aromatic hydrocarbons and their metabolism in the marine environment. Polycyclic hydrocarbons and cancer (*GELBOIN H.V. ET TSO, P.D.P., EDS.*), *ACADEMIC PRESS, NEW-YORK*, **3**, 1-60.

[25] STEGEMAN J.J. (1989). — Cytochrome P-450 forms in fish : catalytic, immunological and sequences similarities. *Xenobiotica*, **19/10**, 237-245

Article 3

FLAMMARION P. et J. GARRIC (1997) Cyprinids EROD activities in low contaminated rivers : a relevant statistical approach to estimate reference levels for EROD biomarker? *Chemosphere,* 35, 10, 2375-2388.

CYPRINIDS EROD ACTIVITIES IN LOW CONTAMINATED RIVERS : A RELEVANT STATISTICAL APPROACH TO ESTIMATE REFERENCE LEVELS FOR EROD BIOMARKER ?

P. Flammarion and J. Garric

Division Biologie des Ecosystèmes Aquatiques,

Cemagref, 3 bis Quai Chauveau 69336 Lyon cedex 9, France

Abstract

In an attempt to estimate the levels of fish EROD activity in low polluted rivers, three species of cyprinids were collected in four French river sites in the Rhône watershed area. Chemical contamination of fish and sediment was measured. Physiological indices, including condition factor, liver somatic index and gonadosomatic index were calculated to assess fish condition and reproductive status. No significant difference was observed for EROD levels between three sites. A fourth site (Saône) showed a small induced EROD level. Hence, we concluded that EROD levels measured in Ain, Ardèche and Drôme may be considered as useful and relevant control values to be compared with levels in other areas where no suitable upstream values can be obtained. Such a preliminary approach is a first step for the estimation of reference levels which are necessary in the future environmental biomarker monitoring.

Key words

Cyprinids; EROD; reference values; biomonitoring

Introduction

The induction of the CYP1A cytochrome P450 subfamily in fish species has been widely used for many years, both in field and laboratory studies, to detect contaminants including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) or polychlorinated biphenyls (PCBs) in marine and continental aquatic ecosystems [1-3]. There are many reports of induced monooxygenases activities in fish collected in chemically contaminated sites, in particular by pulp and paper mill effluents [4]. Among the monooxygenases, the EROD (ethoxyresorufin O deethylase) activity is particularly responsive to contaminants [2]. Therefore, this biomarker may be used to detect exposure to planar aromatic contaminants, although the ecological relevance of the induction is debated.

Most studies consider upstream-downstream comparisons. However, when suitable upstream values are not available, it might be of great interest to assess EROD levels in a

contaminated area in relation to background EROD levels in non-contaminated areas which may be accepted as reference values of fish EROD activity. Yet, several natural factors modulate the EROD levels, including sex, reproductive status, season and species [5], which makes it difficult to interpret the different EROD levels between two sites. As a consequence, the estimation procedure of "reference EROD values" should take the influencing factors into account.

In the present study, chemical and biological data were collected in 1995 and in 1996 from four river sites, considered as low polluted, in the Rhône watershed: Ain, Ardèche, Drôme and Saône. Three species of cyprinids were sampled twice a year (spring: spawning period, and fall) because reproductive cycle is known to cause fluctuations in EROD levels [6]. Female, male and juvenile were collected when possible. Physiological indices such as condition factor (CF), liver somatic index (LSI), and gonadosomatic index (GSI) were calculated. Hepatic CYP1A was measured by the ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) assay performed with a spectrofluorimeter microplate reader. Chemical contamination of sediment and fish muscle was also considered.

The objectives of this study were thus to compare chemical, physiological and one biochemical parameter (hepatic EROD activity) in low contaminated river sites with a view to estimating EROD reference values. Although such a scientific goal needs a larger data material, we present in this paper the first results and conclusions on this subject.

Materials and methods

Chemicals

7-ethoxyresorufine, β-nicotinamide adenosine-diphosphate reduced (NADPH) were purchased from Sigma Chemicals Co. All other chemicals were of the highest available commercial grade.

Sampling sites

The four sampling sites are located in the Rhône watershed (Fig. 1) and considered as low polluted areas in accordance with French water quality standards (Table 1). Saône was shown to be moderately polluted in comparison to the three other sites. These sites were also chosen with the following criteria: medium-sized river, easy electrofishing, absence of known industrial effluents upstream. Each site was sampled twice in 1995, and Ain was also sampled in 1996.

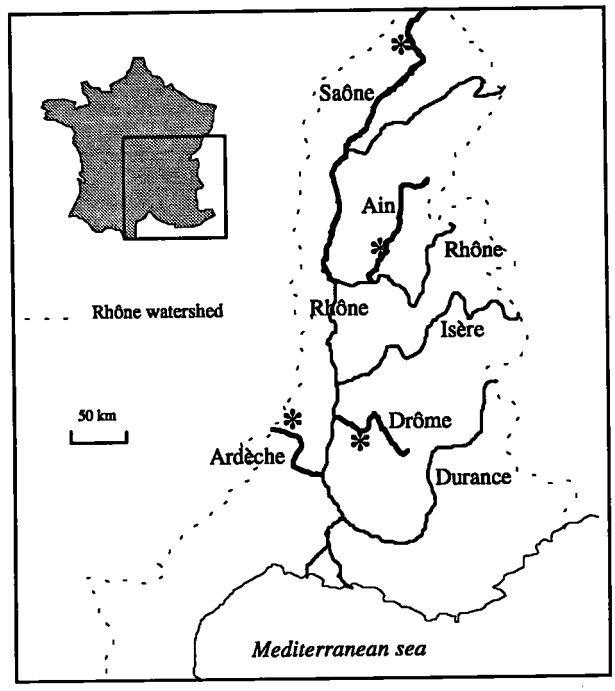


Fig. 1. Location of sampling rivers in the Rhône basin. Stars (*) indicate areas where fish were sampled.

Table 1. Comparison of four river sites in the Rhône watershed (France).

Parameters	Ain	Ardèche	Drôme	Saône
Watershed surface (upstream, km²)	3630	280	1150	1130
River slope (study area, m/km)	1.2	3.8	3.3	0.5
River width (study area, m)	90	50	20	20
Water flow average (m^3/s)	123	17	19	18
pH[a]	8.4-8.1	8.0-7.4	8.2-7.0	7.8-7.5
Conductivity (µS/cm)	340-315	55-43	320-320	358-388
Oxydability (mg O_2/l)	1.9-1.7	0.3-2.2	1.3-0.7	5.3-4.1
NO_3^- (mg/l)	4.3-3.3	1.0-1.5	2.0-2.5	6.4-6.9
PO_4^{3-} (mg/l)	<0.05	<0.05	<0.05	0.9-0.2
Metals (in bryophytes)	None	None	None	As, Hg, Zn
IBGN[b]	17	17	19	12-15
Water quality[c]	good	good	good	low polluted

[a]Chemical data were measured twice during fish sampling and are displayed as follows: spring-fall.
[b]Indice Biologique Global Normalisé [7]: it gives a 0-20 level which summarizes the ecological quality of a river based on the invertebrate communities.
[c]In France, water is graded in five classes from "good quality" to "very polluted". Those data are taken from Agence de l'eau Rhône-Méditerranée-Corse [8].

Sampling of fish and collection of biological data

The three cyprinid species studied were barbel (*Barbus barbus*), chub (*Leuciscus cephalus*) and gudgeon (*Gobio gobio*). These species are common fish in western Europe both in polluted and non-polluted areas. Thus they are good candidates as representative species. Barbel and gudgeon are benthic species and may provide useful information about the chemical contamination of sediment. To take into account the well known changes of EROD activity due

to reproductive status, fish were caught twice: in spring (April-June: spawning period) and in fall (September-October). The spawning period for the three species is from April-May (when water temperature reaches 14-16°C) until July when the photoperiod decreases [9-10].

After fish had been captured by electrofishing, they were immediately sacrificed, weighed, measured, and dissected. Condition factor was calculated from the total weight and length according to the formula:

$CF = (weight(g)/length(cm)^3) \times 100$.

Liver and gonads were removed. Liver was weighed, rinsed in 150 mM KCl, homogenized in 100 mM phosphate buffer (pH 7.8; 20% glycerol), and the homogenates were poured into 1.8 ml cryotubes, frozen in liquid nitrogen and kept for several days at - 80 °C before they were used in the enzymatic assay. Gonads were weighed as well. With barbel and chub adults, liver somatic index and of gonadosomatic index were expressed as the ratio of liver (resp. gonads) weight to total body weight.

EROD assay

Liver homogenates were thawed at 4 °C and centrifuged at 9,000 g. The supernatant (S9) was used for enzymatic assay. EROD activity of the liver S9 was determined at room temperature (20 ± 1 °C) by a modified Pohl and Fouts [11] procedure on a 96-well microplate: EROD activity was assayed in a final volume of 230 µl containing 100 mM phosphate buffer pH 7.8, 0.25 mM NADPH, 2 µM ethoxyresorufin and 10 µl S9 protein. The reaction was started with the addition of NADPH and was followed for 6 minutes by reading the fluorescence every two minutes. Fluorescence was measured by a Cytofluor 2350 spectrofluorimeter (excitation filter 530 nm and emission filter 590 nm) (Millipore, MA, USA). Rhodamin B (230 µl, 0.1 µM) was used to calibrate after standardisation with resorufin. S9 protein concentrations were measured by the method of Lowry et al. [12] using a Sigma kit (N° P5656).

Muscle and sediment sampling

Fish muscle were dissected, conserved at - 20 °C and homogenized. For analysis of the lipid content they were extracted with hexane. Lipid normalisation was indicated since bioaccumulation of hydrophobic chemicals is known to vary almost linearly with lipid content [13-14]. Sediment was collected in the same sites once in 1995. Total organic carbon was determined.

Chemical analysis in sediment and fish muscle

The chemical determination is a multiresidue procedure suitable for the determination of 132 molecules (CEE 76/464) including PCBs, organochloride pesticides and PAHs. Analyses of sediment and muscle were performed by means of dichloromethane extraction followed by analysis on a gas-chromatograph (GC) with electron-capture detection (ECD) or with flame-

ionization detection (FID) or coupled with a mass spectrometer (MS). A high performance liquid chromatograph with photodiod array UV detector was used as well.

A 10-g portion of dry sediment was diluted with 50 ml dichloromethane prior to sonication-assisted extraction for 15 minutes. The organic extract was poured into the Soxhlet and the remainder was re-extracted with 50 ml dichloromethane at pH 11 adjusted with 1 ml sodium hydroxyde solution. After extraction, the organic extract was removed and the remainder was re-adjusted to pH 2 with 1.5 ml phosphoric acid and extracted with 50 ml dichloromethane. The organic extracts were combined prior to 6-hour Soxhlet extraction and further 2-hour freezing. The extract was finally concentrated to 10 ml in ethyl acetate. For HPLC analyses, acetonitrile/water (75/25) was used.

For organic extraction of homogenized muscle the same procedure was used but with a microwave-assisted extraction. The final extract (in ethyl acetate) was diluted for lipid content <10 mg/ml. For HPLC analyses, pure acetonitrile was used.

GC-MS consisted of a Varian 3400 capillary gas chromatograph (Varian, Walnut Creek, CA, USA) coupled to a Saturn II Varian mass spectrophotometer and equipped with a Varian 8100 injector. Samples were injected (1 µl) in a DB5MS column (J&W Scientific, Folsom, USA)) with helium as carrier gas (1.5 ml/min). The initial temperature of 45°C was held for 4 min then increased by 7°C/min to 280°C where it was maintained for 23 min. The NIST mass spectral data base was used to assist with the identification of the compounds detected.

GC/ECD/FID was performed with a Varian Star 3400 apparatus using a Varian 8200 injector (1 µl injection). The columns used were DB5 (J&W Scientific) and SGE capillary columns. Nitrogen was the carrier gas. Injector temperature was 300°C. Column temperature increased to 300°C by 3°C/min and held for 34 min. ECD and FID detectors were used.

HPLC was carried out with a Varian 9012 pump, a Varian 9100 injector and a Varian 9065 UV photodiod array detector. Samples (90 µl) were injected in a Supelcosil LC-ABZ (Supelco, Bellefonte, PA, USA) column with a 1 ml/min flow at 40°C.

Metal contents in the sediment were determined, after HNO_3/HCl/HF digestion, by plasma emission spectrophotometry using a Jobin Yvon JY70 (Longjumeau, France) apparatus.

Data analysis

Statistical procedures were performed using STATISTICA software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Data for EROD activities were ln-transformed to pass the normality test (χ^2 test for normality) and the test of homogeneity of variance (Levene's test). Groups were compared by t-tests. The level of significance was set at $p<0.05$ in all cases. In tables and figures, EROD distributions were synthesized with mean ± sd, or median (min; max), or mean ± sd of the ln-transformed data. Mean (EROD) ± sd were only given as information even if they were not relevant position parameters due to the heteroscedasticity of the EROD frequency distributions.

Results

We first studied the levels of the CF, LSI and GSI indices in order to make a basic comparison between the four rivers as far as the physiological status of the cyprinids is concerned. This is a prerequisition for the validity of the comparison of EROD levels between stations.

Physiological indices

CF and LSI showed no difference due to sex or sexual maturation (t-tests: all probabilities > 0.20). However, the three species had different CF levels (one-way ANOVA, $p<0.01$) but no mean effect of season or site was found (one-way ANOVAs, $p=0.33$ and $p=0.15$ respectively). In more details, we found that CF values of barbel and chub in Ardèche and in spring were significantly lower than in the other sites, while they were higher for gudgeon both in spring and in fall. The normal values of CF for barbel, chub and gudgeon were in the range of 1.0-1.2; 1.1-1.3 and 1.0-1.3 respectively.

For barbel and chub, LSI levels were not related to season or to site: LSI (barbel) = 1.6 ± 0.5 (N=51) and LSI (chub) = 1.4 ± 0.5 (N=148): barbel had a relatively larger liver than chub (t-test: $p<0.01$).

The GSI were calculated from males and females data separately. For both species, GSI levels were significantly higher in spring than in fall by 2-3 folds (ANOVA, $F=65$, $p<0.01$). In addition, GSI were 20% higher in females than in males (ANOVA, $p=0.02$).

EROD levels in Ain, Ardèche and Drôme

No significant site effect was detected within EROD values for Ain, Ardèche and Drôme (t-test comparisons of sites for each season, species and sex) while significant site differences from Saône were observed with chub and gudgeon (principally in fall). We thus decided to pool only EROD values of Ain, Ardèche and Drôme sites considering species, sex and season (Table 2). For each fish category (species, sex, season), we calculated, from the normal distribution provided by the ln-transformation, the upper one-sided 95% confidence interval for transformed EROD data to present the upper EROD limit from the three low contaminated sites (noted below as "reference").

Saône site: example of a slight EROD perturbation.

EROD levels for chub and gudgeon in Saône were only slightly different from the reference sites (Table 3). In fall the difference was more marked than in spring. Even if not high overall, it was nonetheless significant for several fish categories. Besides, the comparison of transformed EROD means with upper reference limits gave the same information.

Table 2. EROD activities (in pmol/min/mg protein) and statistical description of EROD distributions for three cyprinids in three low contaminated sites (EROD values were pooled for the three sites). An upper one-sided confidence limit (95%) for ln-transformed EROD is given.

Fish category (species, sex, season)			N	EROD (mean ± sd)	EROD median (min, max)	Ln-transformed EROD (mean ± sd)	Upper limit[a]
Barbel	Female	Spring	16	12 ± 12	7 (0, 38)	2.04 ± 1.10	2.6
		Fall	13	14 ± 9	11 (4, 35)	2.52 ± 0.57	2.8
	Male	Spring	24	12 ± 10	7 (0, 28)	2.18 ± 0.98	2.6
		Fall	14	5 ± 4	4 (1, 10)	1.48 ± 0.74	2.0
	Juvenile	Spring	6	6 ± 6	5 (1, 16)	1.63 ± 0.93	2.5
		Fall	10	3 ± 4	2 (0, 9)	1.15 ± 0.85	1.7
Chub	Female	Spring	30	5 ± 5	3 (0, 17)	1.50 ± 0.75	1.8
		Fall	29	3 ± 4	2 (0, 14)	1.21 ± 0.69	1.5
	Male	Spring	25	10 ± 10	9 (0, 22)	2.17 ± 0.77	2.5
		Fall	24	8± 5	7 (1, 19)	2.05 ± 0.58	2.3
	Juvenile	Spring	14	21 ± 22	15 (4, 80)	2.72 ± 0.89	3.2
		Fall	30	12 ± 13	9 (1, 56)	2.22 ± 1.00	2.7
Gudgeon	Female	Spring	15	10 ± 12	6 (1, 46)	2.02 ± 0.89	2.5
		Fall	20	25 ± 19	19 (5, 72)	3.04 ± 0.67	3.4
	Male	Spring	17	31 ± 17	20 (12, 78)	3.25 ± 0.46	3.6
		Fall	20	18 ± 12	16 (4, 54)	2.75 ± 0.63	3.1

[a]Estimating ln-transformed EROD means and standard deviations from the usual sample mean, X and standard sample deviation, s, for every species, sex and season, one can estimate the upper transformed EROD confidence limit (95%) by X+ks with k depending on the sample size (N) and t-Student value (df=N-1, α=0.95) by $k = \frac{t}{\sqrt{N-1}}$.

Table 3. Ln-transformed EROD activities (mean ± sd (N)) for the Saône site and the Ain site (in 1996) and t-test probabilities of identity with EROD reference values. On the right side are presented upper reference intervals (95%) for comparison.

Fish category			Saône		Ain (1996)		Upper
			EROD	t-test (p)	EROD	t-test (p)	EROD limit
Barbel	Female	Spring	-	-	1.8 ± 1.5 (5)	0.70	2.6
		Fall	-	-	2.6 ± 0.7 (2)	0.92	2.8
	Male	Spring	-	-	1.7 ± 0.9 (10)	0.20	2.6
		Fall	1.8 ± 0.8 (3)	0.53	1.4 ± 0.9 (5)	0.75	2.0
	Juvenile	Spring	-	-	1.2 ± 0.9 (10)	0.40	2.5
		Fall	-	-	1.1 ± 0.5 (6)	0.85	1.7
Chub	Female	Spring	1.4 ± 1.0 (10)	0.19	1.5 ± 0.7 (10)	0.80	1.8
		Fall	1.7 ± 0.7 (10)	0.04	1.2 ± 0.4 (10)	0.48	1.5
	Male	Spring	2.5 ± 0.3 (8)	0.21	2.3 ± 0.7 (10)	0.38	2.5
		Fall	2.6 ± 0.4 (9)	0.01	2.1 ± 0.6 (9)	0.88	2.3
	Juvenile	Spring	3.6 ± 0.6 (10)	0.02	2.9 ± 1.1 (10)	0.65	3.2
		Fall	2.9 ± 0.6 (10)	0.02	2.7 ± 0.5 (7)	0.20	2.7
Gudgeon	Female	Spring	2.1 ± 1.0 (5)	0.84	1.7 ± 1.1 (10)	0.42	2.5
		Fall	3.3 ± 0.4 (10)	0.23	3.0 ± 0.5 (10)	0.97	3.4
	Male	Spring	3.6 ± 0.4 (5)	0.22	3.0 ± 1.0 (10)	0.22	3.6
		Fall	3.4 ± 0.4 (10)	<0.01	3.0 ± 0.4 (10)	0.37	3.1

-: no fish caught.

EROD data from a second annual sampling on the Ain site in 1996

With a view to confirming the EROD values in low polluted sites, we sampled cyprinids in 1996 on the Ain site in May and in September. Among the three low polluted sites, Ain is the only one with systematic presence of the three cyprinids. No significant difference could be found between EROD values of Ain (in 1996) and EROD values of the reference sites (in 1995) (Table 3). We concluded in the same way when comparing EROD values from Ain between 1995 and 1996: probabilities (t-tests) were above 0.2 except for barbel male in spring (p=0.1), chub juvenile in fall (p=0.1) and gudgeon female in spring (p=0.1) (data not shown).

Discussion

Physiological indices

Physiological indices are often measured simultaneously with P450 dependent monooxygenases measurements [4, 15]. The fish CF values may be slightly increased with an exposition to pulp and paper mill effluents [4]. LSI could be a useful non-specific indicator of chemical water pollution when it is significantly greater in fish from contaminated areas than in those from less contaminated rivers [16]. The fish caught in the four sites of this study did not present any difference between locations and between seasons for CF and LSI. These four sites are less affected than other sites in the Rhône river downstream an important chemical area (data not shown), where chub were found to have CF and LSI levels significantly higher, respectively about 1.4 and 1.7. The four stations are thus similar among each other and without nutritional or pollution-related changes strong enough to modulate CF or LSI. This enables reliable comparisons of EROD levels between the sites and between the years.

EROD factors

We may wonder if the number of factors necessary to describe EROD basal levels could be reduced. Yet, a three-way ANOVA on transformed EROD data for the factors species, sex and season (Table 4) showed that species and sex are the main factors, while season was significant only in interaction with sex.

Table 4. Results from a three-way ANOVA for ln-transformed EROD data in the reference sites (adult fish).

Source of variation	Sum of squares	df	F	p
Species	48.38	2	42.95	<0.001
Sex	4.36	1	7.75	0.006
Season	0.08	1	0.13	0.714
Species-Sex	14.98	2	13.30	<0.001
Species-Season	1.92	2	1.70	0.185
Sex-Season	10.96	1	19.45	<0.001
Species-Sex-Season	9.66	2	8.57	<0.001

Other studies showed similar ANOVA when comparing these factors [17]. Sexual differences and seasonal variations are interpreted in relation to sexual maturation: the female hormone oestradiol-17β is known to depress monooxygenases activities [18-19]. Sexual differences were observed for chub in both seasons: female levels were significantly lower than male ones. Sexual difference was also noted for gudgeon in spring but not in fall. In spring, no sexual difference was found for barbel as previously observed [20], but a surprising significant male<female was detected in fall (due to low EROD levels in Drôme). For chub and gudgeon, differences between male and female EROD levels were similar in the Saône site. We should notice that sexual difference seemed to be more marked in spring (spawning period) and that females were more sensitive to season effect, which is consistent with the influence of oestradiol-17β.

Chub were present in all rivers whatever the sex, but the sampling of the other species was more time-consuming and difficult to achieve (see Table 2). Yet, gudgeon, whose small size enables an easy laboratory holding, was proved an appropriate experimental fish therefore facilitating the study of field questionings in laboratory (data not shown). For further biomonitoring in the Rhône watershed, we thus recommend chub and gudgeon samplings. Adults should be caught in fall if possible. Juvenile fish sampling is often said to be free from sexual and seasonal variations of monooxygenases activities [21]. In our study, no interaction was found between species and season for juveniles (ANOVA, p=0.7).

Chemical contamination in sediment and fish muscle in the reference sites

The reference sites were elected through standard chemical and ecological parameters of water quality and through the absence of effluent discharges upstream. In these sites, where low activities were detected, concentrations of chemicals able to modulate the induction (metals, pesticides, PCBs...) were measured.

Sediment from Ain, Ardèche and Drôme (Table 5) appeared to be low contaminated in metals except mercury in Ain and cadmium in Ardèche and in Drôme. Saône levels were quite high for all metals, from 3 to 10 times their respective reference levels. Metals are known to depress monooxygenases activities [23] and the measurement of metal contents was accomplished to provide information about the possible interaction between metals and CYP1A inducers at those sites and, of course, about the water quality for fish living. High metal concentrations in the Saône sediment might hide an higher EROD induction.

No organic compounds were detected in the sediment of Ardèche and Drôme sites. Ain and Saône sediments were found to be close to each other with regard to PAHs levels expressed on dry-weight basis. These total amounts of PAHs were about 1 mg/kg dry wt., which is higher than the level found by Vignier et al. [24] in their reference sediment (0.3 mg/kg dry wt.). Nonetheless, these PAHs contaminations of sediment are much lower than the less polluted sediment (7 mg PAHs/kg dry wt.) with resulting *Pleuronectes americanus* EROD induction [24]. PAHs levels measured in Ain and Saône sediments are thus unlikely to cause EROD induction.

Table 5. Concentrations of contaminants in sediments of four river sites.

mg/kg dry wt.		Ain	Ardèche[a]	Drôme	Saône	Reference[b]
Metals	Arsenic	7.8	5.2	4.1	35.0	5
	Cadmium	ND	1.6	2.2	4.9	0.5
	Chromium	44.4	33.2	44.8	79.7	25
	Copper	25	8.4	15.6	49.7	20
	Mercury	1	0.1	0.2	0.7	0.1
	Nickel	23.6	26.3	27.0	43.4	10
	Lead	32	23.3	13.7	62.2	20
	Zinc	88.9	43.9	56.0	428.0	75
PAHs	Fluoranthene	0.50	ND	ND	0.34	
	Naphtalene	0.05	ND	ND	ND	
	Phenanthrene	0.50	ND	ND	0.33	
	Pyrene	0.33	ND	ND	0.27	
	others	ND	ND	ND	ND	
PCBs[c]		ND	ND	ND	ND	
Other compounds[d]		ND	ND	ND	ND	
Organic carbone[e]		1.8	0.2	0.8	1.0	

ND: Not Detected.
[a]Sediment was sand (dry matter 75%) and concentrations must be considered with caution.
[b]Data from the Water Agency of Rhône-Méditerranée-Corse [22]. A sediment is said to be contaminated when concentrations are twice these reference levels.
[c]Congeners were individually measured.
[d]Other compounds of the CEE 76/464 list were not detected.
[e]Ratio on wet wt. Basis.

Chemical analysis in muscle was done for spring and fall fish samplings to determine levels of bioaccumulated chemicals (Table 6). This was to provide information on the potential presence of bioaccumulated CYP1A inducers. It was not possible to determine gudgeon contamination due to the low amount of fresh muscle of this species.

Table 6. Contaminants bioaccumulation in barbel and chub muscle for four sites and two seasons (spring-fall). Results are displayed as follows: spring value-fall value.

	Ain		Ardèche		Drôme		Saône	
µg/g lipid wt.	barbel	chub	barbel	chub	barbel	chub	barbel	chub
PCB101	0.16-0.04	0.1-ND	0.06-a	ND-ND	0.05-0.29	ND-ND	a-0.26	ND-ND
PCB 118	0.26-0.12	0.12-ND	0.15-a	ND-ND	0.10-0.26	ND-ND	a-0.26	ND-ND
PCB 138	0.90-0.04	0.34-0.12	0.18-a	ND-ND	0.28-0.91	0.13-ND	a-0.20	0.44-0.19
PCB 153	1.47-0.08	0.56-0.27	0.32-a	ND-0.22	0.48-1.11	0.19-ND	a-0.20	0.78-0.39
PCB 180	1.05-0.04	0.38-0.08	0.18-a	ND-ND	0.40-0.71	0.20-ND	a-0.07	1.00-0.39
Lindane	0.37-0.12	0.15-0.08	ND-a	ND-ND	0.75-0.29	0.04-ND	a-1.04	0.22-ND
pp'DDE	0.47-ND	0.47-ND	ND-a	ND-ND	0.63-ND	0.33-ND	a-ND	ND-ND
others	ND-ND	ND-ND	ND-ND	ND-ND	ND-ND	ND-ND	a-αHCH:0.58	ND-ND
Lipid[b]	1.9-2.6	3.2-2.6	3.4-a	NM-0.9	4-3.5	5.4-2.2	a-1.6	0.9-0.5

ND: Not Detected; NM: Not Measured; a: no fish caught; [b]Ratio on fresh wt. basis.

Sleiderink et al. [25] observed that lipid-based PCB concentrations vary only slightly between muscle and liver tissues of the same fish, which was consistent with a comparison that we made between liver and muscle of chub (data not shown) and with other studies [15]. Thus,

we sampled muscle rather than liver because cyprinids liver is less easy to take out than muscle. Levels of PCB congeners 28, 52 and 209 were always above the detection limit (1 µg/kg fresh weight) and they were not presented in Table 6.

In most cases, levels of the measured compounds were higher in barbel than in chub. Feeding behaviour may lead to different exposure patterns and different EROD levels [26]: pollutants while adsorbed to the sediment may be biologically available to barbel and gudgeon grazing in this habitat. We may thus assume that bottom feeders are likely to bioconcentrate quantities of pollutants accumulated in sediment.

In fish, CYP1A is known to be induced by non-ortho PCB congeners [27] which were not detected in this study. However, according to De Boer et al. [28], the concentrations of non-ortho substituted PCBs (IUPAC N° 77, 126, 169) were observed to co-vary (r=0.95) with commonly analyzed PCBs 118, 153. Other studies [15, 29] showed PCB patterns which were quite similar among sampling stations and we may thus assume that PCB 153, usually the dominant congener, is a good marker for all congeners and reflects as well the concentration of non-detected non-ortho congeners.

Saône was not highly different from the three other sites. PCB levels (PCB153) were generally higher in chub muscle for Saône than for the other sites (except Ain in spring), whereas they were not different in barbel muscle. However, those levels of bioaccumulated pollutants are far lower than those of barbel and chub muscle sampled in the Rhône river downstream an industrial area [30], where, for example, levels of PCB 153 in muscle were between 3-10µg/g lipid wt. For Ain sampling in 1996, levels of bioaccumulated chemicals (data not shown) were confirmed to be as low as those of Ain sampling in 1995.

With the four sampling stations, no relationship was found between PCB153 levels and barbel EROD levels. Yet, a positive linear trend was observed for chub males between EROD and PCB153 concentrations (r^2=0.4, N=8), but it was not highly significant (p=0.1) unlike the relationship that we obtained between EROD and PCB153 with chub from polluted sites [30].

In many other studies, levels of contaminants in muscle or in sediment were much more important than in these four sites. For instance, in two locations about 100 km upstream and downstream of Paris, concentrations of PCB153 of 7.3 and 7.6µg/g lipid wt. respectively, Lindane levels of more than 1µg/g lipid wt., pp'DDE of more than 1.5µg/g lipid wt. were measured in the muscle of *Rutilus rutilus* (cyprinid) [31]. Keck and Raffenot [13] measured levels of PCB (Arochlor 1254) in chub and barbel of about 1.3 and 2.7 mg/kg (fresh wt. muscle), whereas in our sites we found less than 0.3 mg/kg in the same fractions. Monod et al. [2] sampled cyprinids in Ain and in Rhône and found total PCB levels of about 0.6 mg/kg (fresh wt. muscle) in Ain fish muscle, and 4-6 mg/kg in Rhône fish muscle with a 3-fold induction of EROD. Concerning the congener PCB 153, Eggens et al. [32] estimated a ratio with total PCB of 1:10 and did not found any relationship between EROD and PCB153 in the range of 0.1-0.4µg/g lipid wt.; these authors cited data from Goksoyr et al. [15], with a PCB153 content of 0.1-4.4 µg/g lipid wt. leading to EROD induction.

Reference EROD data

Mayer et al. [33] stressed that developing a strong background database with the normal range of indicators as well as their statistical confidence limits is essential. However, Lindström-Seppä and Oikari [34] showed the difficulty of choosing several appropriate control areas. By pooling the EROD values from three low contaminated sites, we got EROD values for three cyprinids and two seasons. A low contaminated site (Saône) showed EROD levels higher than the calculated upper 95% confidence interval for the EROD values from the three other sites. This validates, in the case of this study, the accuracy of these estimated EROD reference values. These data are valid control data for the comparison with polluted sites: chub male from several contaminated areas in the Rhône watershed [30] exhibited ln-transformed EROD values in the range of 3-6 while the upper EROD reference limit is 2.5. However, we do not know if lower EROD levels may be measured in cyprinids liver in other areas, and if such EROD values would signify something with regard to contamination. As a matter of fact, a background variation could be related to the presence of potential natural inducers in plants [35] or to intra-species genetic differences among rivers. An interannual validation in these sites as well as in other low polluted sites should then be performed.

Another laboratory cannot use these reference EROD values without any calibration of the enzymatic reaction parameters because the interlaboratory variation of EROD data was proved to be extremely high [36]. Yet, recommended conditions of enzymatic reaction parameters resulted in a coefficient of variation of only 35% between 11 laboratories [37].

Conclusion

From our collection of cyprinids EROD data from various sites of the Rhône watershed, we conclude that no statistical difference was observed between three river areas, all of which were a priori considered to be uncontaminated by effluents likely to induce the CYP1A system. Chemical contamination turned out to be low both in sediment and in fish muscle. A fourth site (Saône river) showed a slight, but significant increase of EROD activity compared to the other sites. Such induction could not be explained with measured PAHs and PCBs. Physiological indices showed that the four sites were comparable to each other.

The three stations of Ain, Ardèche and Drôme seem to be good as control areas for future physiological and biochemical studies on cyprinids. However, establishing relevant reference EROD values needs further investigation in other low contaminated sites with different biotic and abiotic characteristics. This study was complemented by quantifying the effects of both contamination and sexual maturation on the cyprinids EROD levels and by a comparison with previous laboratory data [30]. This current work may contribute to the bases of a large scale biomonitoring network.

Acknowledgements

The authors greatly appreciated the technical assistance of M. Bray, B. Migeon, P. Morfin, B. Motte, G. Rofes, P. Roger (Cemagref, France) and of the fishguards of the French Conseil Supérieur de la Pêche. Chemical analysis were performed thanks to P. Castillo and F. Massat at the Laboratoire Départemental d'Analyses de la Drôme (France). This work was supported, in part, by a GIP Hydrosystèmes grant of the French Ministry of Environment. We thank M.H. Ducret, A. Kosmala, H. Magaud and Prof. P. Vasseur for their comments on an earlier draft.

References

1. J. F. Payne, Field evaluation of benzopyrene hydroxylase induction as a monitor for marine petroleum pollution, *Science* **191**, 945-946 (1976).
2. G. Monod, A. Devaux and J. L. Riviere, Effects of chemical pollution on the activities of hepatic xenobiotic metabolizing enzymes in fish from the river Rhône, *Sci Total Environ* **73**, 189-201 (1988).
3. E. Vindimian and J. Garric, Freshwater fish cytochrome P450 dependent enzymatic activities, a chemical pollution indicator, *Ecotoxicol Environ Saf* **18**, 277-285 (1989).
4. P. Lindström-Seppä and A. Oikari, Biotransformation and other physiological responses in whitefish caged in a lake receiving pulp and paper mill effluents, *Ecotoxicol Environ Saf* **18**, 191-203 (1989).
5. A. Goksoyr and L. Förlin, The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring, *Aquat Toxicol* **22**, 287-312 (1992).
6. T. Andersson and L. Förlin, Regulation of the cytochrome P450 enzyme system in fish, *Aquat Toxicol* **24**, 1-20 (1992).
7. AFNOR, Détermination de l'indice biologique global normalisé (IBGN), NF T90-350, Association française de normalisation (1992).
8. Agence de l'eau Rhône-Méditerranée-Corse, Atlas du Bassin Rhône-Méditerranée-Corse (Oct. 1995).
9. J. C. Philippart, Ecologie des populations de poissons et caractéristiques physiques et chimiques des rivières dans le bassin de la Meuse belge, *Bull Soc Geog Liege* **25**, 175-198 (1989).
10. P. Kestemont, Etude du cycle reproducteur du goujon, *Gobio gobio* L. 1. Variations saisonnières dans l'histologie de l'ovaire, *J Appl Ichthyol* **3**, 145-157 (1987).
11. R. J. Pohl and J. R. Fouts, A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions, *Analytical Biochem* **107**, 150-155 (1980).
12. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, Protein measurement with the Folin phenolreagent, *J Biol Chem* **193**, 265-275 (1951).
13. G. Keck and J. Raffenot, Chemical contamination by PCBs in the fishes of a French river, the Furans (Jura), *Bull Environ Contam Toxicol* **21**, 689-696 (1979).
14. R. van der Oost, H. Heida and A. Opperhuizen, Polychlorinated biphenyl congeners in sediments, plankton, molluscs, crustaceans, and eel in a freshwater lake, implications of using reference chemicals and indicator organisms in bioaccumulation studies, *Arch Environ Contam Toxicol* **17**, 721-729 (1988).
15. A. Goksoyr, A. M. Husoy, E. H. Larsen, J. Klungsoyr, S. Wilhelmsen, A. Maage, E. M. Brevik, T. Andersson, M. Celander, M. Pesonen and L. Förlin, Environmental contaminants and biochemical responses in flatfish from the Hvaler Archipelago in Norway, *Arch Environ Contam Toxicol* **21**, 486-496 (1991).
16. W. Sloof, C. F. van Kreijl and A. J. Baars, Relative liver weights and xenobiotic-metabilizing enzymes of fish from polluted surface waters in The Netherlands, *Aquat Toxicol* **4**, 1-14 (1983).

17. E. Vindimian, P. Namour, B. Migeon and J. Garric, 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 (1991).
18. J. J. Stegeman, A. M. Pajor and P. Thomas, Influence of estradiol and testosterone on cytochrome P-450 and monooxygenase activity in immature brook trout, *Salvelinus fontinalis, Biochem Pharmacol* **31**, 3979-3989 (1982).
19. D. B. O'Hare, R. Siddall, P. W. J. Robotham and R. A. Gill, Influence of oestradiol on induction of EROD activity in roach (*Rutilus rutilus* L.), *Chemosphere* **30**, 1423-1428 (1995).
20. J. L. Hugla, J. C. Philippart, P. Kremers, G. Goffinet and J. P. Thome, PCB contamination of the common barbel, *Barbus barbus* (Pisces, Cyprinidae), in the river Meuse in relation to hepatic monooxygenase activity and ultrastructural liver change, *Netherlands J Aquat Ecol* **29**, 135-145 (1995).
21. T. K. Collier, B. F. Anulacion, J. E. Stein, A. Goksoyr and U. Varanasi, A field evaluation of cytochrome P4501A as a biomarker of contaminant exposure in three species of flatfish, *Environ Tox Chem* **14**, 143-152 (1995).
22. Agence de l'eau Rhône-Méditerranée-Corse, Grilles utilisées pour l'exploitation des données de qualité des cours d'eau acquises dans le cadre des réseaux de mesure (Sept. 1994).
23. P. Flammarion, B. Migeon and J. Garric, Joint effects of copper sulphate and methidathion on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) EROD and AChE activities, *Bull Environ Contam Toxicol* **56**, 440-445 (1996).
24. V. Vignier, J. H. Vandermaulen, J. Singh and D. Mossman. Interannual mixed function oxidase (MFO) activity in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from a coal tar contaminated estuary, *Can J Fish Aquat Sci* **51**, 1368-1375. (1994).
25. H. M. Sleiderink, J. M. Everhaarts, A. Goksoyr and J. P. Boon, Hepatic cytochrome P4501A induction in dab (*Limanda limanda*) after oral dosing with polychlorinated biphenyl mixture clophen A40, *Environ Toxicol Chem* **14**, 679-687 (1995).
26. G. T. Ankley and V. S. Blazer, 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 (1988).
27. J. W. Gooch, A. A. Elskus, P. J. Kloepper-Sams, M. E. Hahn and J. J. Stegeman, Effects of ortho- and non-ortho-substituted polychlorinated biphenyl congeners on the hepatic monooxygenase system in scup (*Stenotomus chrysops*), *Toxicol Appl Pharmacol* **98**, 422-433 (1989).
28. J. de Boer, C. J. N. Stronck, W. A. Traag and J. van der Meer, Non-ortho and mono-ortho substituted chlorobiphenyls and chlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in marine and freshwater fish and shellfish from The Netherlands, *Chemosphere* **10**, 1823-1842 (1993).
29. H. M. Sleiderink, L. Oostingh, A. Goksoyr and J. P. Boon, Sensitivity of cytochrome P450 1A induction in dab (*Limanda limanda*) of different age and sex as a biomarker for environmental contaminants in the Southern North Sea, *Arch Environ Contam Toxicol* **28**, 423-430 (1995).
30. P. Flammarion, B. Migeon and J. Garric, Statistical analysis of cyprinids EROD data in a large French watershed, *Ecotoxicol Environ Saf*, in press.
31. M. Chevreuil, L. Granier and A. M. Carru, Relationship between biological parameters and bioaccumulation of some organochlorides (pesticides, PCB) by fishes in the river Seine (France), *Water, Air and Soil Pollution* **81**, 107-120 (1995).
32. M. Eggens, A. Bergman, D. Vethaak, M. van der Weiden, M. Celander and J. P. Boon, Cytochrome P4501A indices as biomarker of contaminant exposure , results of a field study with plaice (*Pleuronectes platessa*) and flounder (*Platichthys flesus*) from the southern North Sea, *Aquat Toxicol* **32**, 211-225 (1995).
33. F. L. Mayer, D. J. Versteeg, M. J. McKee, L. C. Folmar, R. L. Graney, D. C. McCume and B. A. Rattner, Physiological and non specific biomarkers, In , Biomarkers, biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress, edited by R. J. Huggett, R. A. Kimerle, P. M. Mehrle and H. L. Bergman, *SETAC Special Publications Series,* Lewis publishers, Chelsea, MI, 5-85 (1992).
34. P. Lindström-Seppä and A. Oikari, Biotransformation activities of feral fish in waters receiving bleached pulp mill effluents, *Environ Tox Chem* **9**, 1415-1424 (1990).

35. G. L. Foureman, N. B. White Jr and J. R. Bend, Biochemical evidence that winter flounder (*Pleuronectes americanus*) have induced hepatic cytochrome P-450-dependent monooxygenase activities, *Can J Fish Aquat Sci* **40**, 854-865 (1983).
36. K. R. Munkittrick, M. R. van den Heuvel, D. A. Metner, W. L. Lockhart and J. J Stegeman, Interlaboratory comparison and optimization of hepatic microsomal ethoxyresorufin O-deethylase activity in white sucker (*Catostomus commersoni*) exposed to bleached kraft pulp mill effluent, *Environ Toxicol Chem* **12**, 1273-1282 (1993).
37. M. R. van den Heuvel, K. R. Munkittrick, J. J. Stegeman and D. G. Dixon, Second-round interlaboratory comparison of hepatic ethoxyresorufin-O-deethylase activity in white sucker (*Catostomus commersoni*) exposed to bleached-kraft pulp mill effluent, *Environ Toxicol Chem* **14**, 1513-1520 (1995).

Article 4

FLAMMARION P., MIGEON B. et J. GARRIC. Statistical analysis of cyprinids EROD data in a large French watershed. *Ecotoxicology and Environmental Safety, sous presse.*

Statistical Analysis of Cyprinids EROD Data in a Large French Watershed

PATRICK FLAMMARION, BERNARD MIGEON, AND JEANNE GARRIC

Division Biologie des Ecosystèmes Aquatiques,
Cemagref, 3 bis Quai Chauveau 69336 Lyon cedex 9, France

Abstract

A comparison of EROD data collected in 1995 in various sites in the Rhône watershed (France) was carried out in order to quantify the influence of factors such as contamination and biological parameters on EROD levels and within-group variabilities. Three species of cyprinids were collected and fish chemical contamination was measured. A Log-transformation of EROD data provided both normalization and homogeneity of variances. The influences of female sexual maturation on the variability and on the EROD dimorphism were quantified. A relationship with contaminant bioaccumulation was observed. A comparison with EROD data collected during previous studies by the same laboratory was made to validate those results.

INTRODUCTION

Defining biomarker variabilities (organismal, environmental, methodological) remains essential prior to any regulatory application (Huggett et al., 1992). Among biochemical biomarkers, the measurement of fish EROD activity (Ethoxy Resorufin O Deethylase activity, a cytochrome P450 1A monooxygenase) has become a widespread tool of biomonitoring in marine and continental waters since the 80's (Payne, 1976; Stegeman et al., 1987). It enables to assess biochemically the exposure of aquatic organisms to some industrial contaminants (PAHs, PCBs...).

Most continental studies are selective ones as a comparison of upstream and downstream sites on a river. However, in view of biomonitoring on a large scale, e.g. a watershed, we need a global understanding of how EROD levels might be compared to others which were determined in other sites and other years. Besides, it is well known that many natural factors modulate EROD activity, including sex, season, species, feeding behaviour, etc. (Goksoyr and Förlin, 1992). Many authors observed such biological influences on the EROD pollution warning signal. Yet, the quantification of these within-group variability

factors on sentinel fish species remains necessary to provide a reliable environmental monitoring tool.

In this study our objectives were to compare the magnitude of variation in basal and induced levels of EROD activities and to evaluate the respective contributions on EROD variability of the modulation factors : biological parameters, such as the fish reproductive status, and bioaccumulated pollutants. This statistical analysis should provide a potential estimation procedure of freshwater contamination through EROD levels in the French Rhône watershed. This information would also lead to discuss on the choice of a sentinel fish species as well as a sampling strategy for a large scale biomonitoring program.

We thus sampled in 1995 three freshwater fish species during two seasons in six river areas in the French Rhône watershed. We quantified the induction of cytochrome P450 1A in fish liver using 7-ethoxyresorufin-O-deethylase activity (EROD) and we measured biological parameters (condition factor, liver somatic index, gonado somatic index) as well as bioaccumulated chemicals in muscle (PCBs, organochlorides, pesticides, PAHs). These EROD data were also compared to data previously collected on cyprinids by the same laboratory.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

7-ethoxyresorufine, β-nicotinamide adenosine-diphosphate reduced (NADPH) were purchased from Sigma Chemicals Co (St. Louis, MI, USA). All other chemicals were of the highest available commercial grade.

Sampling sites

The sampling sites were located in the Rhône watershed (Fig. 1). In 1995 six areas were investigated : three unpolluted areas (Ain, Ardèche, Drôme), one moderately polluted area (Saône) and two highly polluted areas (Rhône1 and Rhône 2). We also considered EROD measurements done by the same laboratory on freshwater fish from the Rhône watershed in previous selective studies (Vindimian et al., 1991; Vindimian et al., 1993; Richert, 1994), and we validated a relationships between EROD and bioaccumulated pollutants with results from three stations on the Rhône and the Saône (in spring 1995) : Trévoux, Jons and Vernaison, which were not included in the statistical analysis.

Sampling of fish and collection of biological data

The three cyprinid species studied were barbel (*Barbus barbus*), chub (*Leuciscus cephalus*) and gudgeon (*Gobio gobio*). These species are common fish in western Europe both

in polluted and non-polluted areas. Besides, barbel and gudgeon are benthic species and may thus be exposed to different contamination than chub. In order to evaluate the changes in EROD activity during the year, fish were caught twice : in spring (April-June : spawning period) and in fall (September-October). The three species spawn when temperature reach 14-16°C (April-May) and until July when photoperiod decreases (Kestemont, 1987; Philippart, 1989).

After being captured by electrofishing, fish were immediately sacrificed, weighed, measured, and dissected. Samplings of groups of 10 fish per species and per sex were planned for every site and each season.

Liver and gonads were removed. Liver was rinsed in 150 mM KCl, homogenized in 100 mM phosphate buffer, pH 7.8 with 20% glycerol, poured into 1.8 mL cryotubes. Liver homogenates were frozen in liquid nitrogen and kept for several days at -80°C before enzymatic assay. Gonads were weighed. On barbel and chub adults, gonadosomatic index (GSI) was calculated and expressed as the ratio of gonads weight to total body weight.

EROD assays

Liver homogenates were thawed at 4 °C and centrifuged at 9,000 g. The supernatant (S9) was used for enzymatic assay. EROD activities were measured with a microplate procedure at room temperature (20°C ± 1°C) by a modified Pohl and Fouts (1980) procedure on a 96-well microplate : the enzymatic activity was assayed in a final volume of 230 µL containing 100 mM phosphate buffer pH 7.8, 0.25 mM NADPH, 2 µM ethoxyresorufin and 10 µL S9 protein. The reaction was started with the addition of NADPH and was followed for 6 minutes by reading the fluorescence every two minutes. Fluorescence was measured by a Cytofluor 2350 spectrofluorimeter (excitation filter 530 nm and emission filter 590 nm) (Millipore, MA, USA). Rhodamin B (230 µL, 0.1 µM) was used to calibrate after standardization with resorufin. Enzymatic activities were reported on S9 protein concentrations which were measured by the method of Lowry et al. (1951).

We studied the relationships between the activities given by the microplate procedure and by the conventional method previously used by the laboratory. For the fluorimetric measurement in vials, EROD activity was assayed at 20 °C in a final volume of 1 mL containing 100 mM phosphate buffer pH 7.8, 50 µM NADPH, 2 µM ethoxyresorufin and S9 protein. The reaction was stopped by addition of 2 mL acetone. EROD activities were measured using a spectrofluorimeter (Jobin Yvon JY3D, Longjumeau, France) at 547 nm excitation wavelength and 585 nm emission wavelength after standardization by Rhodamin B.

With log-transformed data, the relationship between EROD values from traditional and microplate methods was Log(microplate)=0.98 Log(vial) N=139, r^2=0.94 confirming a direct proportionality. These two methods were found to provide identical results :

EROD(microplate)=0.99 EROD(vial) (N=139, r^2=0.93). Hence, microplate and conventional EROD activities may be used jointly in statistical analysis.

Muscle sampling and chemical analysis

For every species, we sampled more than 20 g pooled amounts of muscle (with a female:male ratio of 1:1). Fish muscles were stored at -20 °C and homogenized before chemical analysis. Lipid content was measured after extraction with hexane.

The chemical determination is a multiresidue procedure suitable for the determination of 132 molecules (EC 76/464) including PCBs, organochloride pesticides and PAHs. Analyses of muscle were performed by means of dichloromethane extraction followed by analysis on a gas-chromatograph (GC) with electron-capture detection (ECD) or with flame-ionization detection (FID) or coupled with a mass spectrometer (MS). A high performance liquid chromatograph with photodiod array UV detector was used as well.

A 10-g portion of homogenized muscle was diluted with 50 ml dichloromethane prior to microwave-assisted extraction for 15 minutes. The organic extract was poured into a Soxhlet and remain was re-extracted with 50 ml dichloromethane at pH 11 adjusted with 1ml sodium hydroxyde solution. After extraction, the organic extract was removed and remain was re-adjusted to pH 2 with 1.5 ml phosphoric acid and extracted with 50 ml dichloromethane. The organic extracts were combined prior to 6-hour Soxhlet extraction and further 2-hour freezing. The extract was finally concentrated to 10ml in ethyl acetate with a lipid content < 10mg/ml. For HPLC analyses, pure acetonitrile was used.

GC-MS was accomplished with a Varian 3400 capillary gas chromatograph (Varian, Walnut Creek, CA, USA) coupled with a Saturn II Varian mass spectrophotometer and equipped with a Varian 8100 injector. Samples were injected (1µl) in a DB5MS column (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) with helium as carrier gas (1.5 ml/min). The initial temperature of 45°C was held for 4 min, increased to 280°C at 7°C/min where it was maintained for 23 min. The NIST mass spectral data base was used to assist in the identification of the compounds detected.

GC/ECD/FID was performed with a Varian Star 3400 apparatus using a Varian 8200 injector (1µl injection). The columns used were DB5 and SGE capillary columns. Nitrogen was the carrier gas. The injector was heated up to 300°C at 150°C/min. where it was held for 98 min. Column temperature increased to 300°C at 3°C/min. where it was maintained for 34 min. ECD and FID detectors were used.

HPLC was carried out with a Varian 9012 pump, a Varian 9100 injector and a Varian 9065 UV photodiod array detector. Samples (90 µl) were introduced in a Supelcosil LC-ABZ (Supelco, Bellefonte, PA, USA) column with a 1ml/min flow at 40°C.

Data analysis

Statistical procedures were performed using STATISTICA software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, US). Statistical analysis of the frequency distributions was performed prior to further comparison between various groups of fish and to regression analysis. EROD activities and GSI data were Log-transformed to conform to the normality test (χ^2 test for normality) and to the homogeneity of variance (Levene's test). Groups (with a number of fish > 3) were compared by t-tests.

RESULTS

EROD frequency distributions

For every fish groups of field-exposed fish studied in 1995, we plotted the standard deviations versus the means and observed that standard deviations of EROD for every group increased with means : sd(EROD)= 0.72 mean(EROD) (N=62; F=112; r^2=0.7) (Figure 2). This linear relationship leads to use a logarithmic transformation of EROD values in order to stabilize the variance (Tomassone et al., 1993). The transformation :
F(EROD) = Log(1+EROD) provided the best stabilization of the variance. Besides, the Log(1+EROD) distributions of the great majority of the groups studied were Normal ones with sd normally distributed (m = 0.7; s = 0.2; 62 groups). Back to the EROD data, we found that the geometric means could well position populations as well as medians do; as a matter of fact, we found a strong linear relationship between the median and the geometric mean : median(EROD) = 1.04 geometric mean (EROD) (N=62, F=5568, r^2=0.99), which confirmed the quality of the Log-transformation.

We verified such results on EROD data which were collected by our laboratory since 1988 with the same experimental scheme by a fluorimetric procedure on vials. We found a similar relationship between mean and standard deviation :
sd(EROD)=0.76 mean(EROD), (r^2=0.77, N=227, F=808).
The Log(1+EROD) transformation was also found to both normalize the data and to best stabilize variance.

Modulation of EROD variability with factors

For every fish group, EROD levels were described with the Log(1+EROD) means as a relevant measure of the central tendency (Table 1). EROD variability was then quantified with the sd of Log(1+EROD) values providing a measure of the dispersion of the EROD distribution. In Table 2, we quantified the effects of the known factors on the EROD dispersion thanks to one-way ANOVAS on sd of fish groups. No interaction was examined.

No global site-related variability was observed (p=0.2), which is consistent with the independence between sd(Log(1+EROD)) and mean(Log(1+EROD)) assumed to co-vary with

contamination patterns. This result was confirmed whatever species, sex and season were considered. This allowed the comparison of biological factors whatever sampling station. No differences of variability between species or sex and between species for the same sex were found. However, in spring, the variability was significantly higher (p=0.02) than in fall and this seasonal effect on female EROD variability was observed for every species.

Quantification of the EROD sexual difference

We quantified the chub EROD dimorphism in Log(1+EROD) terms. The differences between female and male, considered as individuals, were then found to be slightly but significantly related to the Log(1 + GSI) of the females.

Let "ratio" be the Log(1+EROD) value for a female normalized with the corresponding mean of Log(1+EROD) for the males in the same station and season. Therefore, in spring : ratio=1 - 0.25 Log(1+ GSI) (r^2=0.2, F=15, N=56). In fall, similar relationship could be observed : ratio=1 - 0.24 Log(1+ GSI) (r^2=0.1, F=6, N=55)(Fig. 3).

By using this kind of normalization between males and females, we confirmed that no significant difference could be observed between chub males and females when the Log(1+EROD) levels for the female had been corrected by the Log(1+GSI) levels (Table 3).

Such a statistical relationship is interesting because it quantifies the interaction between the female sexual maturation and the induction. For males no relationship with GSI was found. The sexual dimorphism in spring may be quantified by a ratio of 0.6, which is quite great in comparison with the 0.9 ratio in fall. It implies that the inducibility of pre-spawning females is far lower than that of males, e.g. a female with a GSI of about 10% would have a Log(1+EROD) value 60% less than males, which in EROD terms would represent 10 pmol/min/mg instead of 100 pmol/min/mg. Besides, conclusions on significant differences between female EROD levels from two sites may be erroneous without GSI knowledge. This stresses the importance of quantifying the female sexual maturation.

For Ain, Ardèche and Drôme, Log-transformed EROD and GSI of barbel females were found to be significantly related (but explained only by 6 female with high GSIs). In spring and in fall the ratio between Log-transformed EROD of females and males was about 1 on average, which is consistent with Hugla et al., 1995 whose results indicated no sexual dimorphism for barbel.

With gudgeon, on which no GSI could be measured, in spring the ratio between Log-transformed EROD of females and males was about 0.6-0.7 although it was about 1 in fall. This is consistent with chub results.

No GSI information was available in the previous studies (e.g. Vindimian et al., 1991; Vindimian et al., 1993; Richert, 1994). However, we could examine the ratio between Log(1+EROD) of chub females and males and relate it to the female maturation cycle. Whichever fish group were considered, we observed for cyprinids an annual cycle of the

sexual dimorphism ratio : the ratio was minimum in May-June-July (about 0.6-0.7) and maximum from October to February (about 1). Such information is consistent with our results.

Relationship EROD vs bioaccumulated pollutants

We pooled Log-transformed values of chub males and females EROD activities (after corrected by GSI) and studied the relationships with the detected bioaccumulated pollutants in the chub muscle i.e. PCBs, lindane, pp'DDE, HCB. As far as the six stations of 1995 are concerned, we found the following relationship with congener PCB153 (as a marker of all PCB congeners) :

tEROD=1.8 + 1.6*Log(1+PCB153) (r^2=0.78, N=12) where PCB153 is expressed in µg/g and tEROD is calculated as follows : for male, tEROD=Log(1+EROD) and for female, tEROD=Log(1+EROD)/(1-0.25*Log(1+GSI)).

We tested three results obtained from three chub samplings in the same way and simultaneously in spring 1995 using the model Log(1+PCB153)= -0.8 + 0.6 Log(1+EROD) whose standard error is 0.3 i.e. 30% on PCB153 prediction (Table 4).

The fish caught at Trévoux had PCB153 levels higher than those predicted by EROD activities. We thus may assume a partial destruction of the EROD activity (bad storage) or a possible inhibition of the EROD activity (e.g. by metals). In fact, we observed that this observation could be related to the elevated levels of Hexachlorobezene (HCB) found in the muscle of the fish sampled in Trévoux while this compound is far less concentrated in fish sampled in other stations. The potential inhibitory effect of HCB should be studied in laboratory conditions even if a weak interaction of HCB with the receptor Ah was found (Hahn et al., 1989). It may also be assumed that the large amount of pollutants detected in Trévoux resulted in a poor EROD signal because of a global non-specific toxicity phenomenon on the biological integrity. This stresses the importance of using complementary biomarkers or biological indicators to assess a global biological condition and to avoid misleading conclusions.

For Rhône1, both barbel males and females had Log-transformed EROD levels significantly lower than the reference ones. An inhibition by pollutants may thus be assumed.

Gudgeon muscle amounts which were dissected were too small to allow a correct chemical determination. However, we observed that the difference (expressed in Log(1+EROD)) between highly contaminated sites (Rhône 1 and 2) and reference ones was lower with gudgeon than with chub.

DISCUSSION

The statistical analysis of the frequency distributions of the EROD data should be done prior to any conclusion about different means between two fish groups. The information

which gives the mean and the standard deviation is a synthetic information. Yet Log normally frequency distributed EROD activities were already observed by several authors (Collier et al., 1986; Namour, 1992 , Vindimian et al., 1991). In such a case, the arithmetic mean is only an indicative parameter of the position of the distribution while the geometric mean should be used. In order to test statistical differences between two groups, two statistical strategies can be used : a non-parametric test (no assumption on the distributions is required) or a parametric test after a Log-transformation (further normality and homogeneity of the variance should then be checked). The second strategy allows further use of classical analysis such as ANOVA (Collier et al., 1986; Vindimian et al., 1991; Collier et al., 1995) and linear regression analysis (Vindimian et al., 1993).

Even if GSI measurement seems a rather basic way to quantify fish sexual maturity (Kestemont, 1987), it is clearly cost effective. In particular, GSI levels were found to be positively related to female oestradiol-17β with barbel (Poncin 1988) and rainbow trout (Förlin and Haux, 1990), while a significant correlation between EROD and the inverse of log-transformed oestradiol-17β was observed with Atlantic salmon (Larsen et al., 1992). The role of oestrogens in regulating the hepatic cytochrom P450 system has been studied and it was suggested a possible inhibitory effect of oestrogens. Administration of oestradiol to juvenile *Salvelinus fontinalis* and *Oncorhynchus mykiss* resulted in significant decreases in monooxygenase activities (Stegeman et al., 1982); co-injection of both oestradiol-17β and β-naphthoflavone to cyprinid *Rutilus rutilus* resulted in almost 50% decreases for both basal and induced EROD levels (O'Hare et al., 1995). However, the possible spawning migration of the fish from or to the studied area must be kept in mind and may also explain the greater variability which was observed in spring. Barbel mobility is usually less than 1 km but may reach 5-10km in the spawning period (Baras, 1992). Several authors recommended the sampling of immature fish in order to free from seasonal variations (e.g. Collier et al., 1995). Juveniles are observed to have monooxygenases activities higher than adults and higher inductions (Singh et al., 1985; our data). However, the uncertainity of fish sampling in rivers means that it is necessary to know every fish category EROD variations.

In this study, the chemical information on the contamination was rather poor, which made difficult the investigation of relationships between EROD and chemical concentrations. Such relationships are common : monooxygenases versus bioaccumulated PCBs (e.g. Monod et al., 1988) or versus sediment PAHs (e.g. Vignier et al., 1994) with high correlations. Bioaccumulated chemicals in muscle only give information on chronic exposure in the river area for groups of pooled fish while PCB bioaccumulation is diet and size-dependent (Madenjian et al., 1995). Besides, both kinetics of bioaccumulation and fish exposure to non bioaccumulated chemicals are not assessed by the muscle contamination analysis. It would be of interest to compare the kinetics of the bioaccumulation of an inducer and the kinetics of the subsequent EROD induction. The 'adaptation' phenomenon, i.e. the long-term response of the

EROD induction of fish chronically exposed to inducers, is an important item, as well as studying the ability of highly induced fish, as in site Rhône 2, to respond to a pollution peak containing inducers.

Among PCBs, congener N° 153 is usually the dominant one and is considered a good marker for all congeners (De Boer et al., 1993; Sleiderink et al., 1995b). We observed a good correlation between chub EROD levels and PCB 153 muscle concentrations, while PCB 153 is not a cytochrome P450 1A inducer (Gooch et al., 1989), simply because PCB 153 levels co-vary with inducing PCB (77, 126, 169) often present at very low levels and not measured in this study (De Boer et al., 1993). However, inducers which would not have been detected (simply because they are not bioaccumulated) and which would co-vary in concentration with PCBs might also be responsible for the observed induction. The biological information is powerful when giving a synthetic information on an effect on ecosystems, but finding the chemical cause is far more difficult, without a battery of results of both biological and chemical measures. This is so because only one biological information, modulated by many factors (say N) including various inducers, cannot logically predict chemical concentration of one inducer without the knowledge of the levels of the other N-1 factors.

The three sampled species differ in their feeding behaviour, which may result in different expositions to pollutants, and thus to different EROD activities (Foureman et al., 1983). According to our results, gudgeon may be said to be less sensitive to field-induction than chub. Yet, its feeding behaviour near sediment may be a cause of EROD inhibition when contamination is particularly high as already observed with barbel (Vindimian et al., 1991). As a matter of fact, when inducing these three species with 50mg/kg betanaphthoflavone in the laboratory (data not shown), we observed that gudgeon fish were more induced than barbel and chub.

Besides, in field conditions, metal contamination often happens whereas metals are known to depress monooxygenases activities (Flammarion et al., 1996). In order to detect such inhibition mecanisms, the use of immuno detection of the CYP1A1 protein is recommended (Goksøyr and Förlin, 1992).

Temperature was found to be a significant factor on induction in laboratory conditions (Andersson and Koivusaari, 1985). However , in field conditions contradictory results were found which shows the complexity of the influence of temperature : some authors did not observe temperature effects on monooxygenases (Vindimian et al., 1991) while others did (Jimenez et al., 1990; Sleiderink et al., 1995a). However, we should examine in more detail a potential relationship with the river temperature, known to induce cyprinids spawning (Kestemont, 1987; Philippart, 1989). Such an investigation needs detailed information on the variation of the river temperature which cannot only be quantified by the temperature measured on the fishing day ! For instance Vindimian et al., 1991 did not found any

significant temperature effect which would have explained the sex and species differences in EROD activity among four stations.

In spite of all known modulating factors, a great part of interindividual variability remains. It was already observed by many studies (Foureman et al., 1983; Collier et al. 1995; Vindimian et al., 1991). Collier et al., 1995, found an EROD unexplained variability of 35%. In the French Durance river study, the unexplained variability was 57% in 1989 (calculated from Vindimian et al., 1991) and 61% in 1991 (calculated from Richert, 1994) when the variability is quantified according to Collier et al., 1995, by multiway ANOVAs on known factors (station, season, sex, species,...). With the data collected in 1995 we calculated an unexplained variability of 53%. The reasons for such an interindividual variability remain unknown. Such information could be found through a genetic study comparing EROD inducibility among individuals. Courtenay et al. 1994 studied the CYP1A mRNA variability and concluded that the known modulating parameters could not account for all interindividual variations.

From a biomonitoring management point of view : which species, sex and season should we sample ? As already noted by several authors, the non spawning period should be elected as well as male or juvenile fish. The most abundant species is then to be fished as a priority. Yet, the sampling of both benthic and pelagic species remains interesting. Our field experiences showed that for elected cyprinids it was easier to sample females than males or juveniles, maybe because of their larger length. At least for chub, we might be able to correct EROD variability of females. Yet, the high variabilities of GSI and EROD make the empirical relationship noisy and both interpretation and predictive power may thus be erroneous and controversial (Prairie et al., 1995). The analysis of EROD activities measured in 1996 for the same species and sites as in 1995 should permit a more valid description of the relationship between EROD and GSI.

CONCLUSION

The present study provides an attempt to better understand and quantify the variability of EROD measures in field studies. Yet, such biological information is always multiparametrically determined with numerous roots of variability. A large collection of data is therefore necessary before any conclusion can be made at a watershed scale. We demonstrated the usefulness of a statistical description of the EROD response distribution prior to conventional statistical tests and we emphasized the need for a complete quantification of factors of variability on both background and induced EROD levels, before field management. Such a quantitative purpose may be discussed because it stresses the quantitative value of the biological measure rather than its biological information and

relevance. But the accuracy of the impact assessment by such a biomarker also depends on the good definition and quantification of its variability.

This study will be complemented with and validated by other field samplings and laboratory experiments.

Acknowledgement

We would like to express our satisfaction for the excellent technical assistance of M. Bray, P. Morfin, P. Roger (Cemagref, France) and of the fishguards of the French Conseil Supérieur de la Pêche. Chemical analysis were performed by P. Castillo and F. Massat at the Laboratoire Départemental d'Analyses de la Drôme (France). This work was supported in part by the GIP Hydrosystèmes Program of the French Ministry of Environment. We thank M.H. Ducret, H. Magaud, E. Zuber for their useful comments on an earlier draft of the manuscript.

REFERENCES

Andersson, T., and Koivusaari, U. (1985). Influence of environmental temperature on the induction of xenobiotic metabolism by B-naphthoflavone in rainbow trout, Salmo gairdneri. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **80,** 43-50

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. University of Liège, PhD, 193 p.

Boer, J. de, Stronck, C. J. N., Traag, W. A., and van der Meer, J. (1993). Non-ortho and mono-ortho substituted chlorobiphenyls and chlorinated dibenzo-p-dioxins and bibenzofurans in marine and freshwater fish and shellfish from The Netherlands. *Chemosphere* **10,** 1823-1842.

Collier, T. K., Stein, J. E., and Wallace R. J. (1986). Xenobiotic metabolizing enzymes in spawning english sole (*Parophrys vetulus*) exposed to organic-solvent extracts of marine sediments from contaminated and reference areas. *Comp. Biochem. Physiol.* **84C,** 291-298

Collier, T. K., Anulacion, B. F., Stein, J. E., Goksoyr, A., and Varanasi, U. (1995). A field evaluation of cytochrome P4501A as a biomarker of contaminant exposure in three species of flatfish. *Environ. Tox. Chem.* **14,** 143-152.

Courtenay, S., James Williams, P., Grunwald, C., Konkle, B., Ong T. L., and Wirgin, I. I. (1994). Assessment of within-group variation in CYP1A mRNA inducibility in environmentally exposed and chemically treated atlantic tomcod. *Environmental health perspectives,* **102,** 85-91

Flammarion, P., Migeon, B., and 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.

Förlin, L., and Haux, C. (1990). Sex differences in hepatic cytochrome P-450 monooxygenase activities in rainbow trout during an annual reproductive cycle. *J. Endocrinol.* **124,** 207-213.

Foureman, G. L., White Jr, N. B., and Bend, J. R. (1983). Biochemical evidence that winter flounder (*Pleuronectes americanus*) have induced hepatic cytochrome P-450-dependent monooxygenase activities. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **40,** 854-865.

Goksoyr, A., and Förlin, L. (1992). The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquat. Toxicol.* **22,** 287-312.

Gooch, J. W., Elskus, A. A., Kloepper-Sams, P. J., Hahn, M. E., and Stegeman, J. J. (1989). Effects of ortho- and non-ortho-substituted polychlorinated biphenyl congeners on the hepatic monooxygenase system in scup (*Stenotomus chrysops*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **98,** 422-433.

Hahn, M. E., Goldstein J. A., Linko P., and Gasiewicz T. A. (1989). Interaction of hexachlorobenzene with the receptor for 2,3,7,8,-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin *in vitro* and *in vivo*. *Arch. Biochem. Biophys.* **270,** 344-355.

Huggett, R. J., Kimerle R. A., Mehrle P. M., and Bergman H.L. (1992). *Biomarkers : biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress.* SETAC Special Publications Series, Lewis Publishers, Chelsea, US.

Hugla, J. L., Philippart, J. C., Kremers, P., Goffinet, G., and Thome, J. P. (1995). PCB contamination of the common barbel, *Barbus barbus* (Pisces, Cyprinidae), in the river Meuse in relation to hepatic monooxygenase activity and ultrastructural liver change. *Netherlands J. Aquat. Ecol.* **29,** 135-145.

Jimenez, B. D., Oikari, A., Adams, S. M., Hinton, D. E., and MacCarthy, J. F. (1990). Hepatic enzymes as biomarkers : interpreting the effects of environmental, physiological and toxicological variables. In *Biomarkers of environmental contamination* (J. F. Mac Carthy. and L. R. Shugart Eds), pp. 123-142. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.

Kestemont, P. (1987). Etude du cycle reproducteur du goujon, *Gobio gobio* L. 1. Variations saisonnières dans l'histologie de l'ovaire. *J. Appl. Ichthyol.* **3,** 145-157.

Larsen, H. E., Celander, M., and 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.

Lowry, O. H, Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenolreagent. *J. Biol. Chem.* **193,** 265-275.

Madenjian, C. P., Whittle, D. M., Elrod, J. H., O'Gorman, R., and Owens, R. W. (1995). Use of a simulation model to reconstruct PCB concentrations in prey of Lake Ontario Lake trout. *Environ. Sci. Technol.* **29,** 2610-2615.

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

Namour, P (1992). *Les mono-oxygénases de poissons, un outil pour la caratérisation des pollutions chroniques.* Etudes Cemagref, Paris.

O'Hare, D. B., Siddall, R., Robotham, P. W. J., and Gill, R. A. (1995). Influence of oestradiol on induction of EROD activity in roach (*Rutilus rutilus* L.). *Chemosphere,* **30,** 1423-1428.

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

Philippart, J. C. (1989). Ecologie des populations de poissons et caractéristiques physiques et chimiques des rivières dans le bassin de la Meuse belge. *Bull. Soc. Geog. Liege* **25,** 175-198.

Pohl, R. J., and Fouts, J. R. (1980). A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. *Analytical Biochem.* **107,** 150-155.

Poncin, P. (1988). Le contrôle environnemental et hormonal de la reproduction du barbeau, *Barbus barbus* L. et du chevaine, *Leuciscus cephalus* L., en captivité. *Cah. Ethol. Appl.* **8,** 173-330.

Prairie, Y. T., Peters, R. H., and Bird, D. F. (1995). .Natural variability and the estimation of empirical relationships : a reassessment of regression methods. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **52,** 788-798.

Richert, C., (1994). Comparaison de marqueurs biochimiques chez les poissons et d'indicateurs écologiques pour le diagnostic *in situ* de la pollution toxique dans les cours d'eau. Thèse de l'Université Claude Bernard-Lyon I, 190p.

Singh, H., Pavgi-Singh, S., Kezic, N., and Kurelec, B. (1985). Xenobiotic and endobiotic induction of mixed function monooxygenase in carp Cyprinus carpio. *Sci. Total Environ* **44,** 123-133.

Sleiderink, H. M., Beyer, L., Everaarts, J. M., and Boon, J. P. (1995a). Influence of temperature on cytochrome P450 1A in dab (Limanda limanda) from the southern North sea : results from field surveys and a laboratory study. *Mar. Environ. Res.* **39,** 67-71.

Sleiderink, H. M., Everhaarts, J. M., Goksoyr, A., and Boon, J. P. (1995b). Hepatic cytochrome P4501A induction in dab (*Limanda limanda*) after oral dosing with polychlorinated biphenyl mixture clophen A40. *Environ. Toxicol. Chem.* **14,** 679-687.

Stegeman, J. J., Pajor, A. M., and Thomas, P. (1982). Influence of estradiol and testosterone on cytochrome P-450 and monooxygenase activity in immature brook trout, *Salvelinus fontinalis. Biochem. Pharmacol.* **31,** 3979-3989.

Stegeman, J. J., Teng, F. Y., and 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.

Tomassone, R., Dervin C. And Masson, J. P. (1993). *Biométrie Modélisation de phénomènes biologiques*. Masson, Paris.

Vignier, V., Vandermaulen, J. H., Singh, H., and Mossman, D. (1994). Interannual mixed function oxidase (MFO) activity in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from a coal tar contaminated estuary. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **51,** 1368-1375.

Vindimian, E., Namour, P., Migeon, B., and 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.

Vindimian, E., Namour, P., Munoz, J. F., Gril, J. J., Vindimian, E., Migeon, B., and Garric, J. (1993). Ethoxyresorufin-O-deethylase induction in fish from a watershed exposed to a non-point source pollution of agricultural origin. *Wat. Res.* **27,** 449-455.

TABLE 1

Cyprinids EROD levels in the Rhône watershed in 1995.

EROD activities and GSI levels are expressed as median (minimum, maximum) (N) and Log(1+EROD) data are displayed as mean ± sd.

Site	Species	Season	EROD			Log(1+EROD)			GSI	
			Female	Male	Juvenile	Female	Male	Juvenile	Female	Male
Ain	Barbel	Spring	10 (0 ; 30) (4)	13 (1 ; 28) (9)	10 (3 ; 16) (3)	1.8 ± 1.6	2.4 ± 0.8	2.3 ± 0.6	2 (1 ; 3)	1 (0 ; 6)
		Fall	9 (6 ; 12) (3)	8 (1 ; 10) (5)	ND	2.3 ± 0.3	1.9 ± 0.8	ND	1 (1 ; 3)	1 (1 ; 1)
	Chub	Spring	3 (1 ; 17) (10)	12 (1 ; 18) (6)	15 (4 ; 80) (10)	1.6 ± 0.8	2.3 ± 0.8	2.7 ± 0.9	2 (1 ; 13)	4 (1 ; 6)
		Fall	2 (1 ; 6) (9)	8 (1 ; 18) (4)	8 (0 ; 56) (10)	1.1 ± 0.5	1.9 ± 1.1	2.0 ± 1.0	2 (1 ; 3)	2 (1 ; 2)
	Gudgeon	Spring	13 (7 ; 25) (5)	23 (12 ; 57) (7)	ND	2.6 ± 0.4	3.3 ± 0.5	ND	ND	ND
		Fall	24 (15 ; 65) (10)	18 (5 ; 54) (10)	ND	3.3 ± 0.5	2.8 ± 0.8	ND	ND	ND
Ardèche	Barbel	Spring	3 (2 ; 3) (2)	20 (0 ; 27) (5)	ND	1.3 ± 0.2	2.4 ± 1.3	ND	8 (7 ; 9)	3 (1 ; 4)
	Chub	Spring	4 (0 ; 14) (10)	8 (3 ; 22) (10)	ND	1.5 ± 1.0	2.1 ± 0.5	ND	6 (2 ; 8)	6 (1 ; 12)
		Fall	2 (1 ; 11) (9)	8 (3 ; 19) (10)	19 (3 ; 41) (10)	1.4 ± 0.7	2.2 ± 0.4	2.8 ± 0.7	2 (1 ; 3)	1 (1 ; 3)
	Gudgeon	Spring	4 (1 ; 46) (10)	26 (15 ; 78) (10)	ND	1.7 ± 0.9	3.3 ± 0.5	ND	ND	ND
		Fall	13 (5 ; 73) (10)	16 (4 ; 28) (10)	ND	2.8 ± 0.7	2.7 ± 0.5	ND	ND	ND
Drôme	Barbel	Spring	9 (2 ; 38) (10)	6 (0 ; 28) (9)	2 (0 ; 6) (3)	2.3 ± 1.0	1.9 ± 1.0	1.0 ± 0.8	2 (1 ; 10)	3 (1 ; 8)
		Fall	12 (4 ; 35) (10)	3 (0 ; 8) (9)	2 (0 ; 9) (10)	2.6 ± 0.6	1.3 ± 0.7	1.2 ± 0.9	2 (1 ; 3)	1 (1 ; 1)
	Chub	Spring	3 (2 ; 6) (10)	6 (0 ; 16) (8)	15 (4 ; 60) (4)	1.4 ± 0.3	1.9 ± 0.8	2.8 ± 1.0	3 (2 ; 6)	5 (3 ; 6)
		Fall	1 (0 ; 5) (9)	5 (3 ; 15) (10)	2 (0 ; 10) (10)	0.8 ± 0.4	2.0 ± 0.5	1.2 ± 0.7	2 (1 ;3)	1 (1 ; 1)
Saône	Barbel	Fall	ND	9 (1 ; 10) (3)	ND	ND	1.8 ± 0.8	ND	ND	1 (1 ; 2)
	Chub	Spring	1 (1 ; 24) (7)	12 (7 ; 19) (8)	43 (11 ; 65) (10)	1.3 ± 0.9	2.5 ± 0.3	3.6 ± 0.6	4 (2 ; 7)	2 (1 ; 3)
		Fall	4 (1 ; 13) (10)	14 (5 ; 19) (9)	15 (4 ; 36) (10)	1.8 ± 0.7	2.6 ± 0.4	2.9 ± 0.6	2 (1 ; 3)	1 (1 ; 3)
	Gudgeon	Spring	4 (2 ; 37) (5)	39 (21 ; 66) (5)	ND	2.1 ± 1.3	3.6 ± 0.4	ND	ND	ND
		Fall	28 (13 ; 42) (10)	28 (16 ; 53) (10)	ND	3.3 ± 0.4	3.4 ± 0.4	ND	ND	ND
Rhône 1	Barbel	Fall	3 (0 ; 11) (7)	2 (0 ; 13) (9)	ND	1.4 ± 0.9	1.4 ± 0.9	ND	1 (0 ; 2)	1 (0 ; 1)
	Chub	Spring	17 (2 ; 59) (10)	38 (2 ; 83) (10)	22 (3 ; 47) (10)	2.7 ± 0.8	3.4 ± 1.0	2.8 ± 1.0	2 (1 ; 5)	2 (1 ; 5)
		Fall	23 (15 ; 127) (8)	18 (8 ; 171) (10)	83 (2 ; 219) (10)	3.5 ± 0.8	3.1 ± 1.0	4.2 ± 1.2	1 (0 ; 2)	1 (1 ; 2)
	Gudgeon	Spring	6 (2 ; 10) (2)	ND	ND	1.8 ± 0.9	ND	ND	ND	ND
		Fall	102 (46 ; 186) (10)	ND	ND	4.6 ± 0.5	ND	ND	ND	ND
Rhône 2	Chub	Spring	40 (2 ; 164) (9)	95 (79 ; 214) (10)	77 (23 ; 158) (6)	3.1 ± 1.5	4.7 ± 0.3	4.3 ± 0.7	2 (1 ; 11)	3 (1 ; 5)
		Fall	50 (11 ; 106) (10)	55 (46 ; 64) (3)	317 (53 ; 379) (10)	3.9 ± 0.6	4.0 ± 0.2	5.6 ± 0.6	3 (1 ; 5)	1 (1 ; 1)
	Gudgeon	Spring	6 (2 ; 124) (10)	37 (2 ; 194) (7)	ND	2.3 ± 1.1	3.5 ± 1.7	ND	ND	ND
		Fall	152 (101 ; 206) (6)	ND	ND	5.0 ± 0.3	ND	ND	ND	ND

Note. EROD activities are expressed in pmol/min/mg of proteins. ND : no fish could be sampled or no GSI was measured.

TABLE 2

Results of one-way ANOVAs on standard deviations of Log(1+EROD) of cyprinids in the Rhône watershed in 1995.

Factor	Categories	sd(Log(1+EROD)) (nb groups)	F	p
Station	Ain	0.71 ± 0.20 (11)		
	Ardèche	0.74 ± 0.27 (10)		
	Drôme	0.75 ± 0.24 (10)	1.6	0.2
	Saône	0.59 ± 0.30 (10)		
	Rhône1	0.95 ± 0.22 (9)		
	Rhône2	0.83 ± 0.40 (8)		
Specie	Barbel	0.87 ± 0.20 (10)		
	Chub	0.75 ± 0.27 (32)	1.0	0.4
	Gudgeon	0.70 ± 0.38 (16)		
Sex	Female	0.76 ± 0.28 (24)		
	Male	0.71 ± 0.34 (23)	0.5	0.6
	Juvenile	0.82 ± 0.22 (11)		
Season	Spring	0.84 ± 0.33 (31)	5.5	0.02
	Fall	0.66 ± 0.23 (27)		

Note. Only sd of groups with more than 4 fish were used. No interaction was studied. EROD activities are expressed in pmol/min/mg of proteins.

TABLE 3

Effects of Log(1+GSI) correction on Log(1+EROD) sexual dimorphism of chub for every station and both sampling seasons in 1995 in the Rhône watershed.

Probabilities P (Log(1+EROD)female = Log(1+EROD)male) were calculated by t-tests.

Station	Season	Probability	Probability (after Log(1+GSI) correction)
Ain	Spring	0.14	0.98
	Fall	0.10	0.50
Ardèche	Spring	0.10	0.34
	Fall	0.03	0.62
Drôme	Spring	0.03	0.75
	Fall	<0.01	0.09
Saône	Spring	<0.01	0.28
	Fall	<0.01	0.35
Rhône1	Spring	0.06	0.51
	Fall	0.32	0.08
Rhône2	Spring	<0.01	0.69
	Fall	0.62	0.02[a]

[a] Only three males were caught.

TABLE 4

Prediction of PCB153 (µg/g LW) in chub muscle by Log(1+EROD) means of chub female and male from three additional sites in the Rhône watershed.

Station	Log(1+EROD) male[a]	Log(1+EROD) female	transformed Log(1+EROD) female	pooled Log(1+EROD) (male+female)	predicted PCB153	observed PCB153
Trévoux	2.5	1.5	2.8	2.8	1.0	5.2
Jons	3.6	2.6	4.0	3.8	2.6	2.0
Vernaison	4.2	3.4	4.3	4.3	4.3	5.1

[a]EROD in pmol/min/mg of proteins.

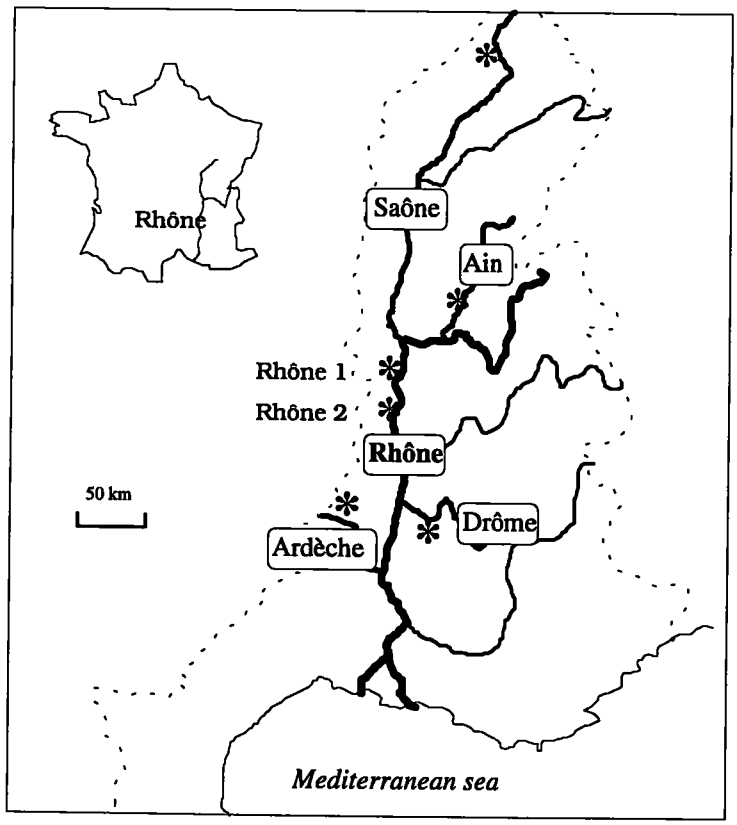


FIG. 1. Map of the sampling rivers (*) in the Rhône watershed.

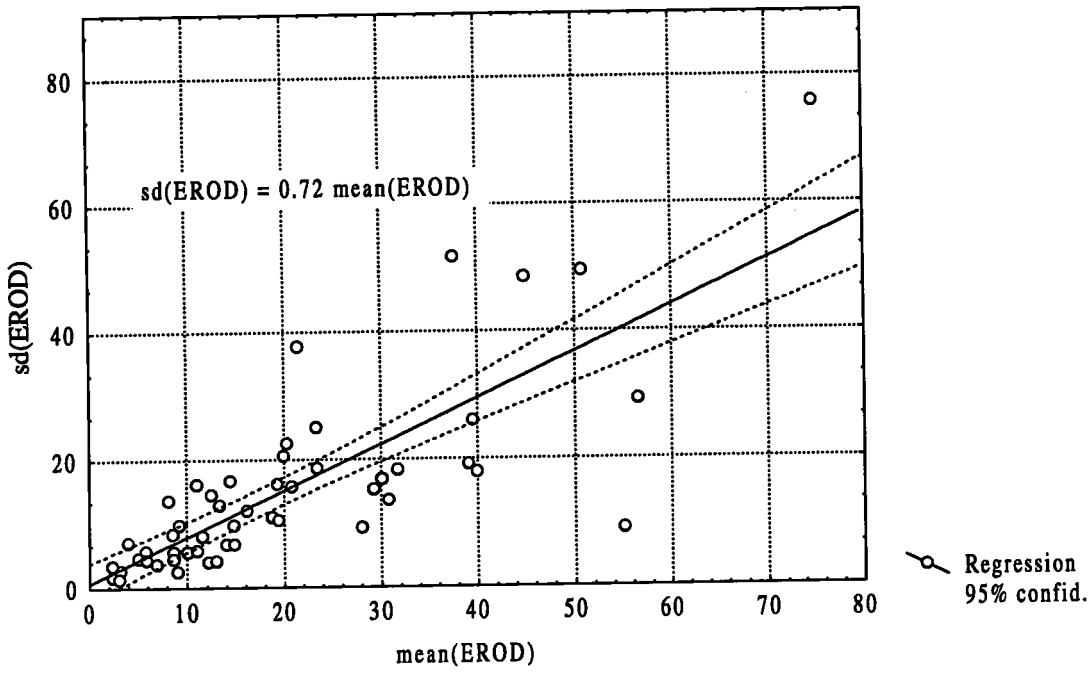


FIG. 2. Correlation between mean and standard deviation (sd) of EROD data from cyprinids caught in sites of the French Rhône watershed. Each point represents (mean, sd) of EROD activities (in pmol/min/mg of protein) of a fish group (species, sex, site, season).

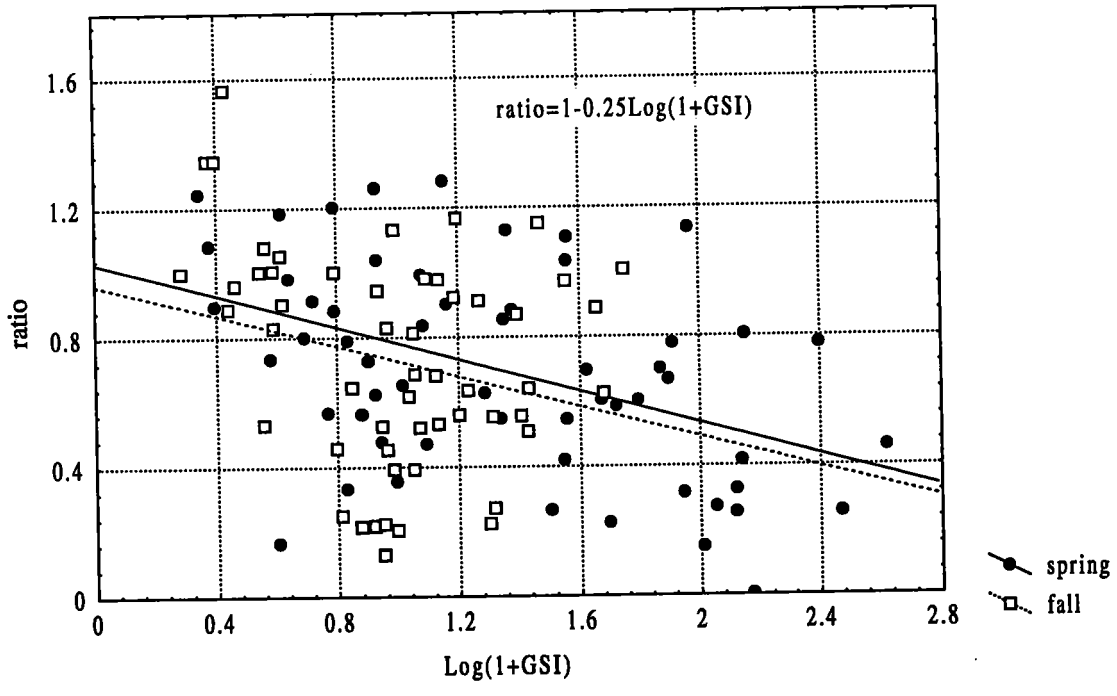


FIG. 3. Relationships between the relative (female:male) Log(1+EROD) levels of chub and the Log(1+GSI) levels of the female, in spring (●) and in fall (□). The ratio was calculated as the quotient between individual Log(1+EROD) female levels and the corresponding mean of male for the same site and season. The global correlation was calculated considering the whole data. EROD activities are expressed in pmol/min/mg of proteins.

Article 5

FLAMMARION P., FORTIER V., MIGEON B., MORFIN P. et J. GARRIC. Variabilities in Cytochrome P450 1A induction in gudgeon (*Gobio gobio*) as a field and laboratory fish species. *Environmental Toxicology and Chemistry, soumis.*

Variabilities in Cytochrome P450 1A Induction in Gudgeon (*Gobio gobio*) as a Field and Laboratory Fish Species

Patrick Flammarion, Véronique Fortier, Bernard Migeon, Philippe Morfin and Jeanne Garric

Division Biologie des Ecosystèmes Aquatiques,
Cemagref, 3 bis Quai Chauveau 69336 Lyon cedex 9, France

Abstract

The induction of cytochrome P450 1A was studied in gudgeon (*Gobio gobio*), a common European cyprinid, using both farm-raised and field-caught fish. The effects on the induction of factors such as gender, reproductive status and past exposure to xenobiotics were assessed both in field and in laboratory conditions. When exposed to beta-Naphthoflavone (bNF), reared gudgeon showed a dose-dependent increase of EROD activity with a plateau observed at doses from 20 mg/kg (females) and 5 mg/kg (males). The sexual difference in EROD activity was quantified and observed to be related to the gonado somatic index (GSI) of the female whatever the level of induction. Dose and sex effects were confirmed by the immunodetection of CYP 1A protein. More than one month was necessary for EROD activity to decrease to baseline levels. A second bNF injection after 32 days gave similar levels of induction, suggesting that EROD induction by bNF was not impaired by a pre-treatment. Wild fish were brought from two sites in the Rhône river basin : a low contaminated site (Ain) and a highly contaminated site (Rhône). Wild gudgeon were highly induced by bNF in laboratory, except males from the Rhône site which exhibited EROD levels as high as the EROD plateau found in laboratory conditions. A 2-month depuration period in clean water was necessary for EROD activity in wild gudgeon to decrease to baseline levels. This was consistent with the decrease in bioaccumulated PCB in fish muscle. These results provide a quantification of the main factors of modulation of the induction in gudgeon as well as better knowledge on the influence of the history of exposure to inducers.

Keywords

EROD ; Fish ; *Gobio gobio* ; Biomonitoring

INTRODUCTION

Among biochemical biomarkers, the measurement of fish EROD activity (Ethoxy Resorufin O Deethylase activity, a cytochrome P450 1A dependent monooxygenase) is one of the best documented responses to contaminants such as dioxins, PAHs, PCBs. But, the degree of induction of EROD activity may vary depending on species, sexual maturity, feeding behaviour, inhibitors etc. [1]. That may lead to difficulty in the assessment of induced or non induced levels.

To improve our ability to accurately interpret data from field studies, it is essential to quantify the factors of EROD variability in both field and laboratory conditions as well as to conduct controlled laboratory experiments on sentinel fish species.

Many assumptions from field observations can only be studied in laboratory experiments, such as studies on the species sensitivity to induction [2], time-course of induction over extended periods [3-5], natural factors of variability [6], and inducibility and reversibility of EROD levels of fish continuously exposed to inducers [7-10]. However, only few EROD studies, using caging techniques, have used same fish species both in field and in laboratory conditions [4 ; 11-14].

In western European continental waters, gudgeon (*Gobio gobio*), a common and non-migratory cyprinid, is an appropriate sentinel species. We studied gudgeon EROD induction in fish from the field [15]. The small size of gudgeon enables an easy holding in laboratory. In addition, gudgeon can be obtained both from the field and from a fish farm.

The objective of the study was to describe the induction of cytochrome P450 1A in gudgeon from the field and from the laboratory taking into account three main factors : dose of inducing compound, sexual maturity and history of exposure to pollutants. In laboratory, this was done by evaluating effects on EROD variability by reproductive status (quantified as GSI, gonadosomatic index) and inducing pollutants (modelled as bNF, beta-naphthoflavone). A multiple bNF injection was also carried out to study the EROD response in the case of successive contaminations. In addition, we compared the induction of cytochrome P450 1A in fish from two distinct sites, and we examined the EROD inducibility and reversibility with wild gudgeon brought to laboratory.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

7-ethoxyresorufine, β-nicotinamide adenosine-diphosphate reduced (NADPH), beta-Naphthoflavone (bNF), Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) were purchased from Sigma Chemicals Co (St. Louis, MI, USA). Aroclor 1254 was obtained from Cluzeau (Sainte Foy la Grande, France). Mouse anti-cod CYP1A IgG monoclonal antibodies, Mab NP-7 were obtained from Terra Miljølaboratorium AS (Bergen, Norway). All other chemicals were of the highest available commercial grade.

Sampling of wild fish from two river locations

The sampling sites were located in the Rhône watershed (South East of France) : one low polluted area (Blyes in the Ain river, control area) and one highly polluted area (Sablons-Serrières in the Rhône river, polluted area). Metals and organics are the major contaminants in the Rhône site located downstream a large industrial area, whereas the Ain site is a reference

area [15-16].

Gudgeon (*Gobio gobio*) were sampled in spring (May-June : cyprinids spawning period) and in fall (September-October). The maximal temporal segregation between samplings of the two sites was one month long. After being captured by electrofishing, fish were immediately sacrificed, weighed, measured, and dissected.

Experimental fish holding

Gudgeon (10.7 ± 6 cm ; 12 ± 3 g) were obtained from a local fish farm in central France (C. Giraud, Fournols, France). Fish were held during at least two weeks before experiments in dark tanks supplied with a 1.2 L/kg/min water flow rate (temperature = 17 ± 1 °C ; conductivity = 490 ± 10 µS/cm ; pH = 7.2 ± 0.2 ; dissolved oxygen = 8.0 ± 0.5 mg/L). Fish were fed Trouvit (Trouw, Fontaine-les-Vervins, France) at a rate of 1 % body weight a day. Feeding was stopped 24h before both injection and sacrifice. Fish were maintained on a 8:16-h dark:light photoperiod. All reared gudgeon were spawning fish (experiments 1 and 2).

Experiment 1 : cytochrome P4501A induction by bNF in reared gudgeon-dose response and gender differences

Cytochrome P450 1A induction was obtained by intraperitoneal injection (i.p.) with bNF in peanut oil. Each dose (0 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10 ; 20 ; 50 ; 100 mg bNF/kg) was administered once as 100 µL/10g to female and male gudgeon. Exposure was 4 days long.

Experiment 2 : reared gudgeon-time dependence of induction and repeated injection

Gudgeon were treated with 4, 8, 16 and 32 day of 50 mg bNF/kg exposures and dissected. Then, 32-d pre-treated fish were injected with 1 or 50 mg bNF/kg and dissected 4 days later to test the influence of a repeated injection on the induction of EROD activity.

Experiment 3 and 4 : wild gudgeon-inducibility by bNF and reversibility of induction

For two studies, wild fish were gently brought to the laboratory and dissected when planned : 3 days after a 50 mg bNF/kg injection or 2 months after a depuration study in clean laboratory water. We placed fish in the same temperature and conductivity as in the field site. With these depurated fish, chemical analyses in muscle were performed so as to compare the potential parallelism, if so, between the decrease of induction and the decrease of bioaccumulated pollutants.

EROD assay

After fish were sacrificed, liver and gonads were removed. Liver was rinsed in 150 mM KCl, homogenised in 100 mM phosphate buffer, pH 7.8 with 20% glycerol and PMSF, poured into 1.8 mL cryotubes. Liver homogenates were frozen in liquid nitrogen and kept for

several days at -80°C before enzymatic assay. Gonadosomatic index (GSI) was calculated and expressed as the ratio of gonads weight to total body weight. This was done only in laboratory with experimental fish because of the low precision of the field balance.

Liver homogenates were thawed at 4 °C and centrifuged at 9,000 g. The supernatant (S9) was used for enzymatic assay performed at room temperature (20 ± 1 °C) by a modified Pohl and Fouts [17] procedure on a 96-well microplate [15]. Enzymatic activities were reported on S9 protein concentrations measured by the method of Lowry et al. [18].

Preparation of microsomal fractions

Just after EROD dosage, S9 supernatants were pooled and centrifuged at 105 000 g for 1 hour at 4°C. The microsomal pellets were resuspended in homogenisation buffer (100mM phosphate, pH 7.8, 1mM EDTA, 1mM DTT, 20% glycerol). Microsomal proteins were determined according to [18].

Western blotting

SDS-PAGE gels (10% polyacrylamide) were performed according to Laemmli [19]. Microsomal proteins (20 µg loadings) were transferred to nitro-cellulose membrane and immunodetected using enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Life Sciences, Little Chalfont, England) 10-fold more sensitive than colorimetric methods [20]. The immunodetection procedure used a mouse anti-cod CYP1A monoclonal antibody (Biosense Laboratories, Bergen, Norway) at a 1/200 dilution and a anti-mouse horseradish peroxidase-linked secondary antibody (BioRad, Hercules, CA, USA) at a 1/1000 dilution. The bound HRP catalyses an enhanced chemiluminescent reaction producing light captured on film (1 min exposure, Kodak Biomax film). Image recording and processing were performed by Visilog 4.1 (Noesis, France).

Chemical analysis of fish muscle

The chemical determination of bioaccumulated pollutants in gudgeon was performed with gudgeon from the Rhône site and brought to laboratory for the depuration study. This is a multiresidue procedure suitable for the determination of 132 molecules (EC 76/464) including PCBs, organochloride pesticides and PAHs. In this study, only PCBs were detected in the fish muscle.

PCB analyses were performed on a gas-chromatograph (GC) with electron-capture detection (ECD). A 10-g portion of homogenised muscle was extracted twice (neutral, acidic) with 50 ml dichloromethane/aceton (1 : 1) using an Accelerated Solvent Extraction (ASE 200 Dionex) for 5 minutes at 100°C. The organic extracts were combined prior to 2-hour freezing and final concentration to 10 ml in ethyl acetate. GC/ECD was performed with a Varian Star 3400 apparatus using a Varian 8200 injector (1 µl injection). The columns used were DB5

(J&W Scientific) and SGE capillary columns. Nitrogen was the carrier gas. The injector was heated up 300°C at 150°C/min and held for 34 min.

Data analysis

STATISTICA software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, US) was used for all statistical analyses (ANOVA, regression, Student's t-test). EROD and GSI data were Log-transformed to conform to the normality test (χ^2 test for normality) and to the homogeneity of variance (Levene's test). Geometric means give then reliable position parameters. The 95% confidence intervals (95% CI) were calculated using the critical values of Student's t-distributions.

RESULTS

CYP 1A induction in wild and reared gudgeon

A 2-year study of EROD levels in gudgeon from Ain and Rhône showed that EROD activities in the Rhône site were 5-10 times higher than in the Ain station (Fig. 1). Sexual differences in EROD activities were higher in spring, the spawning period. Temporal differences in Rhône results may be due to temporal variability of pollution (e.g. higher inducing contamination in spring 96 than in spring 95).

In laboratory, gudgeon baseline EROD activities did not vary significantly over the course of the experiments (6 months) for both males and females. Then, we obtained geometric means (and 95 CI) of baseline EROD activities for females and males of respectively 4 (2-7) (N= 37) and 12 (7-17) (N= 44). In addition, EROD induction by 50 mg bNF/kg (dissection 4d after treatment) proved to be reproducible for both females and males. The bNF-treatment lead to a 10-fold induction of EROD activity in gudgeon (Fig. 1). Reared gudgeon were sexually mature fish which explains the difference between females and males in both control and induced EROD levels.

Those experimental results show the reproducibility of the experiments with gudgeon in laboratory. In addition, those experimental activities were quite similar to control and induced field levels (Fig. 1).

The induction of cytochrome P450 1A in gudgeon from the Rhône site was confirmed by the immunodetection of CYP1A protein (Fig. 2). The anti-cod CYP1A Mab recognized a protein band in the 55-60 kDa region with microsomes from both bNF-treated and field-induced gudgeon.

Experiment 1 : cytochrome P4501A induction by bNF in reared gudgeon-dose response and gender differences

Maximum EROD activities were observed for males at doses from 5 mg/kg and for females at doses from 20 mg/kg (Fig 3). No sexual difference in EROD activity was detected

at 50 and 100 mg/kg, suggesting that female EROD activity plateau was as high as that for males (i.e. about 100 pmol/min/mg protein). The 0.5 mg bNF/kg i.p. injection was enough to significantly induce EROD activities of both females ($p=0.04$) and males ($p<0.01$) whereas CYP1A protein was not detected at this dose (Fig. 4).

A two-way ANOVA was performed to test for differences due to dose and sex. At doses <20 mg/kg, dose and sex effects were highly significant ($p<0.001$) while the interaction was not significant ($p=0.20$). That confirmed that EROD activities of males were higher than females ones whatever the dose.

In addition, the female within group variability was higher than male one (Fig. 3). The EROD within group variability was quantified with the sd of Log(1+EROD) distribution. No dose effect on such dispersion was observed, whereas a strong sex effect was detected ($p<0.01$) : sd(females) = 1.07 ± 0.29 and sd(males) = 0.45 ± 0.17.

The higher variability observed for females may be due to the sexual maturity. Considering each bNF dose we observed a significant relationship between EROD and GSI. That was found only with females, and the results of the linear regression analyses were dose dependent (Table 1). Then, we looked for a more general model such as Log(1+EROD) as a function of GSI : if « ratio » is the Log(1+EROD) level for a female normalised with the corresponding mean for males with the same bNF treatment, then

$$\text{ratio} = \frac{\text{Log}(1+\text{EROD})_{(\text{female})}}{\text{mean}(\text{Log}(1+\text{EROD}))_{(\text{males})}} = 1{,}3 - 0{,}35\text{Log}(1+\text{GSI}) (R^2 = 0{,}5 \; ; \; p < 0{,}05)$$

By correcting female Log(1+EROD) levels with GSI, we confirmed that no significant difference could be observed between males and females in Log(1+EROD) levels (a two-way ANOVA, with dose and sex as factors, did not find either significant effect of both factors or interaction).

Experiment 2 : reared gudgeon-time dependence of induction and repeated injection

After a 50 mg bNF/kg injection, EROD induction was constant for females and for males for 4, 8, and 16 days (Fig. 5). However, after 32 days, female EROD activities had significantly decreased and were not different from control ($p=0.5$). Male EROD activities had also significantly decreased, but they were still higher than control ($p<0.05$) (Table 2). Then, we tested the inducibility of EROD activity in 32d bNF pre-treated gudgeon with an additional injection of 1 or 50 mg bNF/kg. These doses were chosen because the first one evaluates the EROD sensitivity while the second dose evaluates the maximum of induction (considering the dose-response curve in Fig. 3). EROD activities after an additional injection were consistent with those of the dose-response curve (Fig. 3).

Experiment 3 : wild gudgeon-inducibility by bNF

An additional induction was performed on fish from both sites (Ain and Rhône) to test the responsiveness of EROD induction. A 3-d bNF experiment at a 50 mg/kg dosing

significantly induced ($p<0.01$) EROD activities of all fish groups from Ain and Rhône, except males from Rhône (Fig. 6) whose EROD activities were as high as the EROD plateau (see Fig. 3). In addition, identical EROD induction was obtained with gudgeon from both Ain and Rhône. This suggests that a maximum induction was obtained.

Experiment 4 : wild gudgeon-reversibility of induction

Gudgeon from the Rhône site were brought into laboratory water to observe the potential EROD decrease over months. No gender EROD difference was observed because fish were sampled in fall, so only pooled results of adult gudgeon are shown in Fig.7. The EROD decrease was significant (about -60%) after 1 month and EROD activities were as low as levels of Ain (in Fall) after 2 months. Only PCBs were detected in gudgeon muscle from the Rhône site. PCBs levels (as Aroclor 1254) were also found to decrease over the duration of the experiment (Fig. 7).

Then, we compared the inducibility (with 50 mg/kg of Aroclor 1254 and dissection 4 days after the injection) in reared gudgeon and in depurated wild gudgeon (Table 3). Induced EROD activities were equivalent, suggesting the integrity of inducibility in wild fish from the Rhône site.

DISCUSSION

We improved our knowledge about the variabilities of cytochrome P450 1A induction in gudgeon both in laboratory and in field conditions taking exposure, sexual maturity and history into account. This study represents the first analysis on the EROD response in gudgeon from both the field and a fish farm.

Gudgeon proved to be a suitable species for laboratory and field studies. We had also used chub (*Leuciscus cephalus*) in field studies to quantify the EROD induction downstream a chemical plant [21] and a wastewater treatment plant [22]. In addition, we quantified both chub sexual difference in EROD activity as well as the relationship between EROD and the bioaccumulated organochlorides [15]. However, because of its large size, it was not possible to hold adult chub in laboratory conditions which would allow further quantification of sex effect on EROD induction. But, results obtained with immature chub, brought from the same field sites, confirmed conclusions made with gudgeon as far as inducibility and reversibility are concerned (unpublished data).

Our study dealt with wild fish kept in the laboratory. This was shown of concern when studying e.g. alterations of monooxygenase enzyme activities after a change in the fish living habitat : the transfer of the fish to laboratory, although gently processed, may be stressful and cause a decrease in EROD activity [4]. Yet, we did not observe such decrease when field-induced fish had been transferred to the laboratory just after electrofishing. In addition, fish from the control site responded to bNF treatment in the same range as reared gudgeon did.

In the first part, we determined a dose-response curve of EROD activity in gudgeon

injected with bNF. The results are in agreement with earlier studies of fish treated with bNF. EROD activity was detectably induced at 0.5 mg/kg as already observed with rainbow trout [23] and EROD activity appeared to plateau at ~ 10-20 mg/kg. The maximum of EROD induction was reached at doses of 10-50 mg/kg and after 3-4 days of exposure [24-27].

GSI measurement allows quantification of gudgeon sexual maturity [28], and GSI levels were found to be positively related to female oestradiol-17β with barbel [29] and rainbow trout [30]. Thanks to GSI measurement, we quantified the sexual difference in EROD activity which was found to be negatively related to the GSI levels of female gudgeon just prior to spawning. This is in agreement with the inhibitory effect of oestrogens : administration of oestradiol to juvenile *Salvelinus fontinalis* and *Oncorhynchus mykiss* resulted in significant decreases in monooxygenase activities [31]; co-injection of both oestradiol-17β and bNF to cyprinid *Rutilus rutilus* resulted in almost 50% decreases for both basal and induced EROD levels [32].

In addition, when taken into account the GSI level of the female, we found a decrease in the variance (38% in place of 51% ; males : 21%) that could not be explained by the ANOVA grouping variables (sex, dose). Such unexplained variability was already observed to be high [15 ; 33].

The global relationships observed with bNF-treated female gudgeon between EROD and GSI is quite similar to these found with wild female gudgeon brought into laboratory (ratio = 1.3 -0.35 Log(1+GSI) (r^2=0.5 ; F=20 ; N=19)) (data not shown) and with adult female chub (ratio = 1.0 - 0.25 Log(1+GSI) (r^2=0.2 ; F=15 ; N=56)) [15]. This might be of practical interest when sampling adult fish for the EROD determination : only 10 adult could be analysed in place of 10 females and 10 males. In this prospect, a more precise field balance (<1g) should be used because of the small size of gudgeon gonads.

We observed a significant decrease of EROD activity only one month after an injection with 50 mg/kg. A period of 16 days was not sufficient to observe such a decrease, whereas O'Hare et al. [32] observed a decrease after 6 days with *Rutilus rutilus* treated with 100 mg bNF/kg, and Kloepper-Sams and Stegeman [25] after 12 days with *Fundulus heteroclitus* injected with 50 mg bNF/kg. The conflicting results observed in literature concerning time dependence of EROD induction are likely to be due to the dose and kind of the inducer as well as to the fish species. Some authors reported sustained activity only with the highest concentrations while a decrease could be observed with the lowest concentrations [34]. It was also observed that EROD maximum was attained rapidly and that EROD activity slowly declines or remains constant over months with TCDD [3] or PCB [35]. Such discrepancies in temporal pattern of induction may be attributed to the kinetics of metabolization of the inducer : dioxins are more slowly metabolized than PAHs and are persisting at active inducing levels [8].

In the present study, we observed that treatment of gudgeon with bNF did not alter their responsiveness towards a second injection of bNF. In contrast, Celander and Förlin [8]

observed that a pre-treatment with PCB lead to a decrease in response when fish were treated with PCB again, and a non induction when fish were furthermore injected with 3-MC. According to these authors, a possible explanation could be that the Ah receptor was being either converted or degraded. Thus, in the Rhône River, highly contaminated with PCBs and HAPs [15], the prior exposure of fish could have affected their inducibility, as already observed with a prior exposure to PCB [7-8]. Yet, our results suggest that inducibilities by bNF (immediately the arrival at laboratory) and by Aroclor 1254 (after a 2-month depuration period) were not impaired. In contrast, Prince and Cooper [10] observed that *Fundulus heteroclitus* populations from a chemically impacted site (with elevated EROD activities) could not be induced by TCDD, while non impacted fish showed a great increase. This may suggest that the impacted fish were resistant to the ability of TCDD to induce EROD activity because of an alteration in the Ah receptor complex : a 90-d clean water depuration on chemically impacted fish did not decrease EROD activities and did not change their non-inducibility. We did not observe such phenomenon, which might indicate that the field induction in fish from Rhône is caused by more rapidly metabolised compounds. Besides, the decrease observed in fish brought into clean water suggests that these fish did not suffer from a genetic alteration, acquired over successive generations, due to the influence of heavy environmental pressure.

CONCLUSION

This work examined the EROD response in gudgeon both in the field and laboratory. The quantification of the induction as a function of dose, sex and time in laboratory provided the ranges of the induction with lower and upper limits. CYP1A protein was immunodetected by MAb anti-cod both in experimental and wild fish. In addition, taking the time-effect into consideration, studies of sensitivity and reversibility with fish from the laboratory or from the field provided better knowledge for further interpretation of EROD biomonitoring results. As such, gudgeon appears to be an appropriate fish species for biological monitoring work in aquatic environment.

Acknowledgement

The excellent field technical assistance of M. Bray, P. Roger (Cemagref, France) is gratefully acknowledged. This work was supported in part by the GIP Hydrosystèmes Program of the French Ministry of Environment and by a financial help of the Water Agency Rhône-Méditerranée-Corse and of Compagnie Nationale du Rhône. Chemical analyses were performed at the Laboratoire Départemental d'Analyses de la Drôme (France). Dr A. Devaux is gratefully acknowledged for valuable comments on the manuscript.

REFERENCES

1. **Goksoyr, A.** and **L. Förlin.** 1992. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquat. Toxicol.* **22**:287-312.
2. **Förlin, L.** and **M. Celander.** 1993. Induction of cytochrome P450 1A in teleosts : environmental monitoring in Swedish fresh, brackish and marine waters. *Aquat. Toxicol.*, **26**:41-56.
3. **Van der Weiden, M.E.J., M. Celander, W. Seinen, M. Van der Berg, A. GoksØyr** and **L. Förlin.** 1993. Induction of cytochrome P450 1A in fish treated with 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin or chemically contaminated sediment. *Environ. Toxicol. Chem.* **12**:989-999.
4. **Huuskonen, S., T. Rasanen, K. Koponen** and **P. Lindström-Seppä.** 1995. Time-course studies of the biotransformation enzymes in control rainbow trout when adjusting to new habitats. *Mar. Environ. Res.* **39**:79-83.
5. **Eggens, M.L., A.D. Vethaak, M.J. Leaver, G.J.M.J. Horbach, J.P. Boon** and **W. Seinen.** 1996. Differences in CYP1A response between flounder (*Platichthys flesus*) and plaice (*Pleuronectes platessa*) after long-term exposure to harbour dredged spoil in a mesocosm study. *Chemosphere* **32**:1357-1380.
6. **Förlin, L., T. Andersson, U. Koivusaari** and **T. Hansson T.** 1984. Influence of biological and environmental factors on hepatic steroid and xenobiotic metabolism in fish: interaction with PCB and beta-naphthoflavone. *Mar. Environ. Res.* **14**:47-58.
7. **Wirgin, I.I., G.L. Kreamer, C. Grunwald, K. Squibb** and **S.J. Garte.** 1992. Effects of prior exposure history P4501A mRNA induction by PCB congener 77 in Atlantic tomcod. *Mar. Environ. Res.* **34**:103-108.
8. **Celander, M.** and **L. Förlin.** 1995. Decreased responsiveness of the hepatic cytochrome P450 1A1 system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after prolonged exposure to PCB. *Aquat. Toxicol.* **33**:141-153.
9. **Förlin, L.** and **M. Celander.** 1995. Studies of the inducibility of P450 1A in perch from the PCB-Contaminated lake Järnsjön in Sweden. *Mar. Environ. Res.* **39**:85-88.
10. **Prince, R.** and **K.R. Cooper.** 1995. Comparisons of the effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin on chemically impacted and non impacted subpopulations of *Fundulus Heteroclitus* : II. Metabolic considerations. *Environ. Toxicol. Chem.* **14**:589-595.
11. **Jimenez, B.D., L.S. Burtis, G.H. Ezell, B.Z. Egan, N.E. Lee., J.J. Beauchamp** and **J.F. McCarthy.** 1988. The mixed function oxidase system of bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus* : correlation of activities in experimental and wild fish. *Environ. Toxicol. Chem.* **7**:623-634.
12. **Oikari, A.** and **P. Lindström-Seppä.** 1990. Responses of biotransformation enzymes in fish liver experiments with pulpmill effluents and their components. *Chemosphere* **20**:1079-1085.
13. **Jedamski-Grymlas, J., U. Lange, D. Siebers** and **L. Karbe.** 1994. Induction of the hepatic biotransformation system of the Golden Ide (*Leuciscus idus*) after exposure in the river Elbe. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **28**:35-42.
14. **Fenet, H., C. Casellas** and **J. Bontoux.** 1996. Hepatic enzymatic activities of the European eel *Anguilla anguilla* as a tool for biomonitoring freshwater streams: laboratory and field caging studies. *Wat. Sci. Technol.* **33**:321-329.
15. **Flammarion, P., B. Migeon** and **J. Garric.** Statistical analysis of cyprinids EROD data in a large French watershed. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, in press.
16. **Flammarion, P., V. Fortier, B. Migeon, P. Morfin** and **J. Garric.** Cyprinids EROD activities in low contaminated rivers : a relevant statistical approach to estimate reference levels for EROD biomarker ? *Chemosphere*, in press.
17. **Pohl, R.J.** and **J.R. Fouts.** 1980. A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. *Analytical Biochem.* **107**:150-155.
18. **Lowry, O. H, N.J. Rosebrough, A.L. Farr** and **R.J. Randall.** 1951. Protein measurement with the Folin phenolreagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.
19. **Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature (Lond.)* **227**:680-685.
20. **Kloepper-Sams, P.J.** and **E. Benton.** 1995. Application of a sensitive chemiluminescent technique for comparison of cytochrome P4501A induction in hepatic and intestinal tissues of fish exposed to bleached kraft mill effluent. *Mar. Environ Res.* **39**:213-218.

21. **Vindimian, E., P. Namour, B. Migeon** and **J. Garric.** 1991. In situ pollution induced cytochrome P450 activity of freshwater fish : barbel (*Barbus barbus*), chub (*Leuciscus cephalus*) and nasé (*Chondrostoma nasus*). *Aquat. Toxicol.* **21**:255-266.
22. **Kosmala, A., B. Migeon, P. Flammarion** and **J. Garric.** Impact assessment of a wastewater treatment plant using fish biomarker EROD : field and on-site experiments. *Ecotoxicol. Environ. Safety*. In press.
23. **Flammarion, P., B. Migeon** and **J. Garric.** 1996. Joint effects of copper sulphate and methidathion on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) EROD and AChE activities. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **56**:440-445.
24. **Melancon, M.J., C.R. Elcombe, M.J. Vodicnik** and **J.J. Lech.** 1981. Induction of cytochrome P450 and mixed-function oxidase activity by polychlorinated biphenyls and beta-naphthoflavone in carp (*Cyprinus carpio*). *Comp. Biochem. Physiol.* **69C**:219-226.
25. **Kloepper-Sams, P.J.** and **J.J. Stegeman.** 1989. The temporal relationships between P450E protein content, catalytic activity, and mRNA levels in the teleost *Fundulus heteroclitus* following treatment with B-Naphthoflavone. *Arch. Biochem. Biophys.* **268**:525-535.
26. **Stegeman, J.J., K.W. Renton, B.R. Woodin, Y.S. Zhang** and **R.F. Addison.** 1990. Experimental and environmental induction of cytochrome P450E in fish Bermuda waters. *Journal Exp. Mar. Biol. Ecol.* **13**:49-67.
27. **Celander, M., M.J. Leaver, S.G. George** and **L. Förlin.** 1993. Induction of cytochrome P450 1A1 and conjugating enzymes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver : a time course study. *Comp. Biochem. Physiol.* **106C**:343-349.
28. **Kestemont, P.** 1987. Etude du cycle reproducteur du goujon, *Gobio gobio* L. 1. Variations saisonnières dans l'histologie de l'ovaire. *J. Appl. Ichthyol.* **3**:145-157.
29. **Poncin, P.** 1988. Le contrôle environnemental et hormonal de la reproduction du barbeau, *Barbus barbus* L. et du chevaine, *Leuciscus cephalus* L., en captivité. *Cah. Ethol. Appl.* **8**:173-330.
30. **Förlin, L.** and **C. Haux.** 1990. Sex differences in hepatic cytochrome P-450 monooxygenase activities in rainbow trout during an annual reproductive cycle. *J. Endocrinol.* **124**:207-213.
31. **Stegeman, J. J., A.M. Pajor** and **P. Thomas.** 1982. Influence of estradiol and testosterone on cytochrome P-450 and monooxygenase activity in immature brook trout, *Salvelinus fontinalis. Biochem. Pharmacol.* **31**:3979-3989.
32. **O'Hare, D.B., R. Siddall, P.W.J. Robotham** and **R.A. Gill.** 1995. Influence of oestradiol on induction of EROD activity in roach (*Rutilus rutilus* L.). *Chemosphere* **30**:1423-1428.
33. **Collier, T.K., B.F. Anulacion, J.E. Stein, A. GoksØyr** and **U. Varanasi.** 1995. A field evaluation of cytochrome P4501A as a biomarker of contaminant exposure in three species of flatfish. *Environ. Toxicol. Chem.* **14**:143-152.
34. **Muir, D.C.G., A.L. Yarechewski, D.A. Metner, W.L. Lockhart, G.R.B. Webster** and **K.J. Friesen.** 1990. Dietary accumulation and sustained hepatic mixed function oxidase enzyme induction by 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran in rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem.* **9**:1463-1472.
35. **Palace, V.P., J.F. Klaverkamp, W.L. Lockhart, D.A. Metner, D.C.G. Muir** and **S.B. Brown.** 1996. Mixed-function oxidase enzyme activity and oxidative stress in lake trout (*Salvelinus namaycush*) exposed to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB-126). *Environ. Toxicol. Chem.* **15**:955-960.

Table 1. Linear relationship between EROD activity and GSI levels for female gudgeon induced by bNF.

Dose bNF (mg/kg)	N	Linear relationship	R^2
0	20	Log (1+EROD) = 3.9 - 1.2 Log (1+GSI)	0.6*
0.5	10	Log (1+EROD) = 4.1 - 1.3 Log (1+GSI)	0.6*
1	10	Log (1+EROD) = 4.1 - 1.1 Log (1+GSI)	0.6*
2	7	Log (1+EROD) = 5.4 - 1.7 Log (1+GSI)	0.7*
5	10	Log (1+EROD) = 8.3 - 2.7 Log (1+GSI)	0.6*
10	10	Log (1+EROD) = 7.2 - 2.1 Log (1+GSI)	0.7*
20	8	Log (1+EROD) = 5.3 - 0.9 Log (1+GSI)	0.3
50	18	Log (1+EROD) = 6.0 - 1.0 Log (1+GSI)	0.4*
100	9	Log (1+EROD) = 6.1 - 1.1 Log (1+GSI)	0.6*

* p value resulting from the F test of the relationship between Log(1+EROD) and Log(1+GSI) less than 0.05.

Table 2. EROD activities of control- and bNF previously treated gudgeon after receiving a 4d-bNF treatment. Values are given as geometric means with 95% confidence intervals and number of fish in parentheses.

	Female			Male		
	Control	1 mg/kg	50 mg/kg	Control	1 mg/kg	50 mg/kg
Non pre-treated fish	4 (2-7) (37)[b]	9 (4-16) (10)	54 (24-120) (18)[b]	12 (7-17) (44)[b]	44 (29-72) (10)	109 (90-134) (19)[b]
Pre-treated fish[a]	6 (3-12) (10)	14 (6-35) (10)	70 (44-108) (10)	29 (15-54) (10)*	63 (29-120) (8)	98 (59-163) (8)

[a]Gudgeon was first injected 32 days prior to the second injection.
[b]pooled results (see first section of the results).
* significantly different from control fish ($p<0.05$).

Table 3. Effect of a 50 mg/kg i.p. injection of Aroclor 1254 on PCBs levels in muscle and on EROD activity in laboratory gudgeon and in 2-month-depurated gudgeon from the Rhône site. EROD values are given as geometric means with 95% confidence intervals and number of fish in parentheses.

Treatment	PCBs levels (µg/g LW)		female EROD activity (pmol/min/mg protein)		male EROD activity (pmol/min/mg protein)	
	Lab fish	Wild fish	Lab fish	Wild fish	Lab fish	Wild fish
Control	ND	0.9	5 (3-8) (10)	7 (3-18) (10)	15 (9-25) (10)	12 (5-28) (10)
Aroclor 1254	50	53	32 (13-80) (10)*	27 (13-52) (10)*	44 (21-80) (10)*	37 (17-79) (10)*

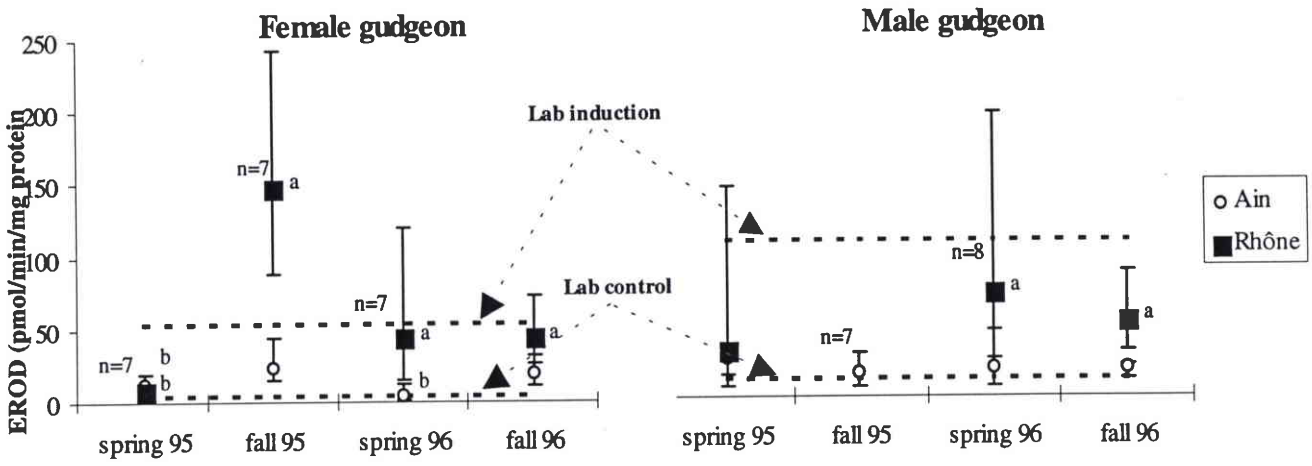


Fig. 1. Comparison of field EROD levels (pmol/min/mg protein) with control and 4-d 50 mg bNF/kg-induced laboratory gudgeon. EROD activities in fish from Ain (O) and Rhône (■) are given as geometric means with 95% confidence intervals. Dashed lines represent the reared-fish EROD levels (do not suggest that lab studies were performed continuously over the 95-96 period). No male could be sampled from the Rhône in fall 1995. Samplings were n=10 otherwise noted in the figure.
a : significantly different from Ain
b : significantly different from males.

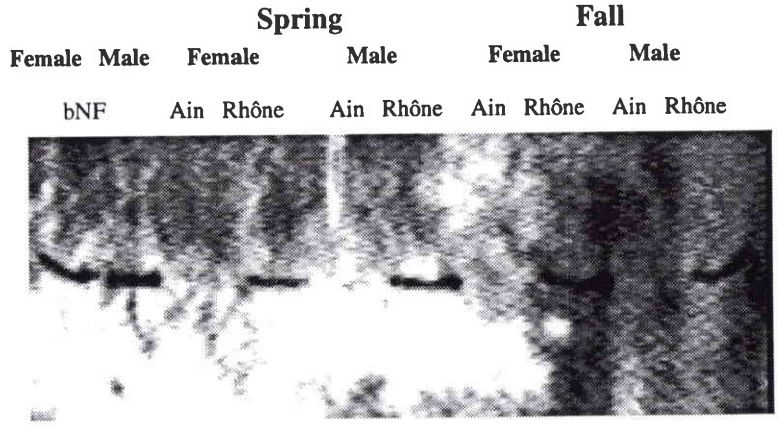


Fig. 2. Immunoblotting of gudgeon hepatic microsomes for cytochrome P4501A using anti-cod Mab. Reared and wild fish were sampled in 1996. Loadings of 20 µg microsomal proteins per lane of the gel.

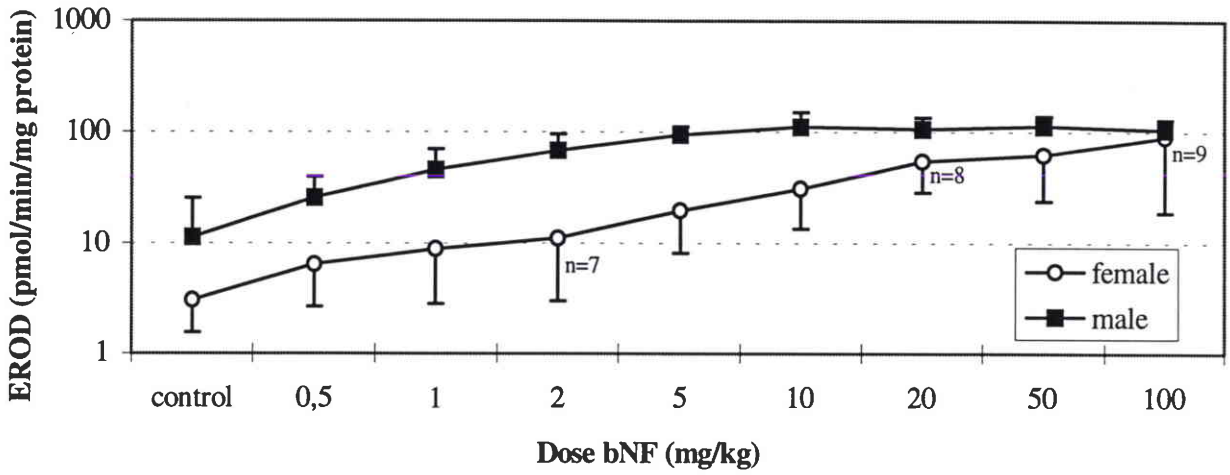


Fig. 3. Gudgeon EROD activities (pmol/min/mg protein) 96 hours after i.p. injection of bNF. Values are given as geometric means with 95% confidence intervals. Samplings were n=10 otherwise noted in the figure.

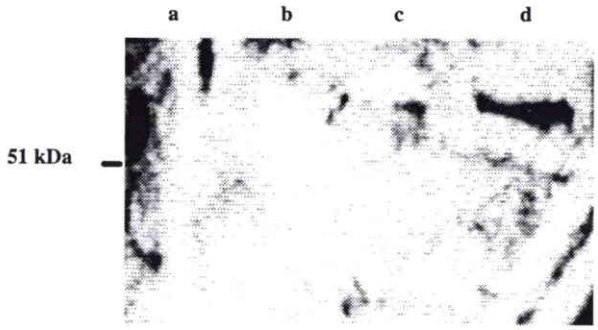


Fig. 4. Male gudgeon CYP1A immunodetection 96 hours after i.p. injection of bNF. Lane a, b, c, and d : 0 ; 0.5 ; 5 and 50 mg bNF/kg respectively.

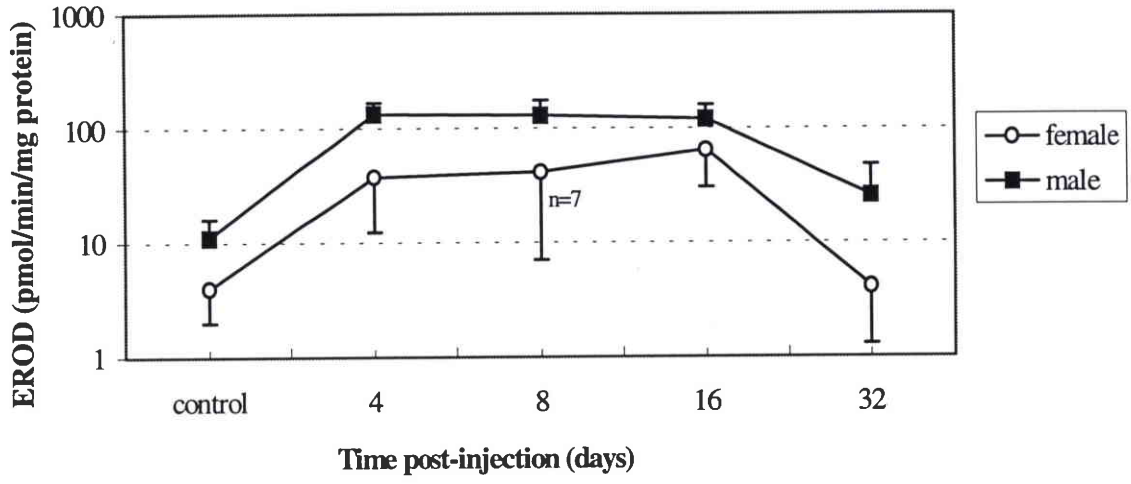


Fig. 5. Time course of EROD activities (pmol/min/mg protein) in female and male gudgeon injected with 50 mg bNF/kg. Values are given as geometric means with 95% confidence intervals. Samplings were n=10 otherwise noted in the figure.

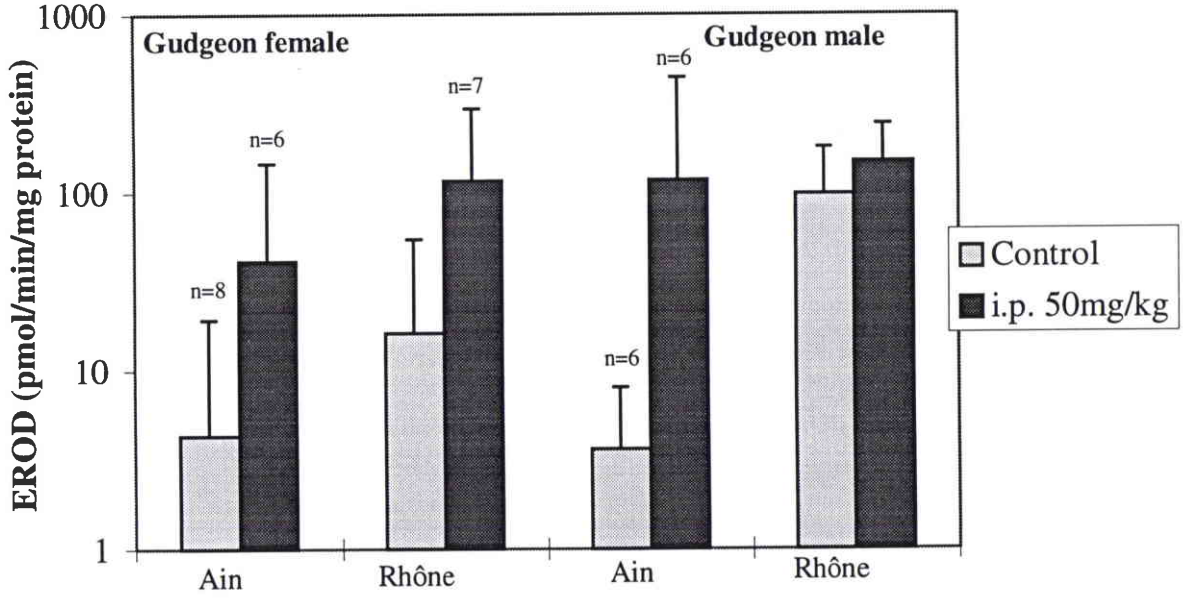


Fig. 6. Effect of a 50 mg bNF/kg treatment on EROD activities (pmol/min/mg protein) of gudgeon from two different sites in spring 1996. Fish were sacrificed 3 days after treatment. Values are given as geometric means with 95% confidence intervals. Fish had also been dissected the day of bNF-treatment to test the laboratory influence during the 3 days. No significant differences were observed. Samplings were n=10 otherwise noted in the figure.

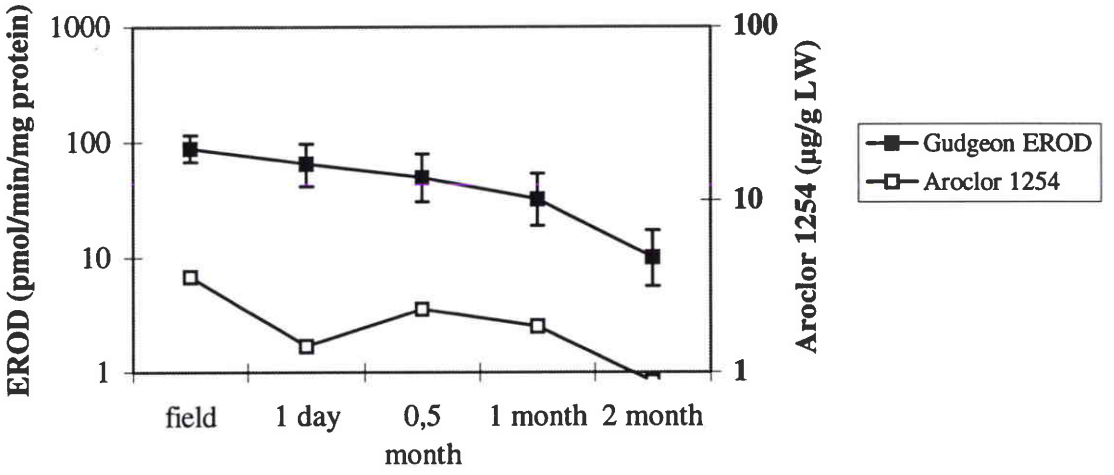


Fig. 7. Effect of a clean water depuration on EROD activity (pmol/min/mg protein) in gudgeon from the Rhône site sampled in fall 1996. EROD values are given as geometric means with 95% confidence intervals. Since no sex differences were observed for EROD activities, pooled results (n=20) were displayed. PCB data points are results from pooled muscle.

Article 6

FLAMMARION P., MIGEON B. et J. GARRIC (1996) Joint effects of copper sulphate and methidathion on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) EROD and AChE activities. *The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 56, 3, 440-445.

Bull. Environ. Contam. Toxicol. (1996) 56:440–445
© 1996 Springer-Verlag New York Inc.

Environmental Contamination and Toxicology

Joint Effects of Copper Sulphate and Methidathion on Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) EROD and AChE Activities

P. Flammarion, B. Migeon, J. Garric

Laboratoire d'Ecotoxicologie, Cemagref, 3 bis, Quai Chauveau, CP 220, 69336 Lyon cedex 09, France

Received: 9 January 1995/Accepted: 30 August 1995

Effects on aquatic organisms of simultaneous exposure to various contaminants, both organic compounds and heavy metals, have been rarely studied (Lemaire-Gony and Lemaire 1992). The measurement of the induction of fish ethoxy-resorufin-O-deethylase (EROD) activity, a cytochrome P450 monooxygenase, has been proposed for the biological monitoring of environmental contamination (Payne et al. 1987) and is frequently used to identify exposure to organic xenobiotics such as polycyclic aromatic hydrocarbons, dioxins, polychlorobyphenyls. Moreover, the inhibition of acetylcholinesterase (AChE) activity is used to detect exposure to organophosphates or carbamates (Bocquene et al. 1990). To improve the significance of such a biological monitoring we need to assess the effects of a complex mixture of both organic xenobiotics and metals on those biomarkers (Gagné and Blaise, 1993).

Trace metals and pesticides are common pollutants in the aquatic environment. For instance, high levels of copper sulphate (metal) and methidathion (organophosphate insecticide) can be measured in a french watershed covered by vineyards (Ardières, South-East of france) (Table 1). Copper is a very toxic heavy metal which is involved in many metabolic pathways leading to a very complex toxicology (Sorensen 1991). Abiotic parameters (pH, conductivity) can modify the speciation and toxicity of copper (Brown et al. 1974). Methidathion is one of the more toxic organophosphates with a high 50 % lethal toxicity on rainbow trout: 96-hr LC50 = 10 µg/L (Montgomery 1993).

In some field conditions where EROD induction and AChE inhibition could be used for the monitoring of water pollution, the joint presence of metals and insecticides may lead to an inhibition of such a monitoring system. This work was carried out to increase the knowledge of those inhibition effects using copper and methidathion in laboratory conditions.

MATERIALS AND METHODS

Methidathion (99.7%) was obtained from Dr Ehrenstorfer BmbH; copper sulphate was purchased from E. Merck, Darmstadt, Germany; acetylthiocholine iodide (ATCI), dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB), 7-ethoxyresorufin, ß-naphthoflavone (5,6 benzoflavone), ß-nicotinamide adenosine-diphosphate reduced form

Correspondence to: P. Flammarion

(NADPH) were purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri. All other chemicals were of the highest available commercial grade.

Juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) weighing 6-11 g obtained from a local fish farm were used for all experiments. Immediately before the exposure, fish were intraperitoneally injected with 0.5 mg/kg of ß-naphthoflavone in corn oil in order to induce EROD activity to a level comparable to that of fish exposed to environmental inducers. AChE activity was not modified by this pretreatement (data not shown). Then, groups of ten trout were exposed to continuous flow of copper (Cu) and methidathion (MD) in combination for 96 hr. Experimental concentrations were chosen considering field concentrations (Ardières) and acute toxicities on rainbow trout (Table 1):

Table 1. Choice of experimental concentrations of xenobiotics.

Pesticides	Field average concentration (µg/L)	Experimental range (µg/L)	Acute toxicity 96-h LC50 (µg/L)
Copper	10	0; 8; 18	105 (unpublished data)
Methidathion	7.8	0; 1; 5	10 (Montgomery 1993)

Cu and MD were added from stock solutions to the continuously flowing dilution water to give the required concentrations. The stock solutions were prepared daily. Cu and MD water concentrations were only controlled once the assay. The nominal and observed Cu concentrations were equal in value. The observed concentrations of MD were 40% lower than the nominal ones: this is maybe due to the low stability of the MD to light. All fish were tested at 17.0 ± 0.1 °C (conductivity 510 ± 10 µS/cm; pH 7.3 ± 0.1; dissolved oxygen 8.7 ± 0.4 mg/L). Temperature, dissolved oxygen, conductivity and pH were measured twice a day. Fish were fed twice daily during experiments.

Four days after injection, fish were sacrified, weighed, measured, and immediately dissected. Liver and muscle were removed. Each liver was rinsed in 150 mM KCl, homogenized in 100 mM phosphate buffer, pH 7.8 with 20% glycerol, poured into cryotubes. Liver homogenates and muscles were frozen in liquid nitrogen and kept for several days at -80 °C before enzymatic assays (Figure 1).

Homogenates or muscles were thawed at 4°C. Prior to AChE assay the muscle was homogenized in Tris HCl 0.1 M pH 7.8. Each liver or muscle homogenate was centrifuged at 9,000 g and the supernatant (S9) was used for enzymatic assays.

EROD activity of the liver S9 was determined at 20°C by a modified Pohl and Fouts (1980) procedure: EROD activity was assayed in a final volume of 1 mL containing 100 mM phosphate buffer pH 7.8, 5 µM NADPH, 0.2 µM ethoxyresorufin and S9 protein. The reaction was stopped by addition of 2 mL acetone.

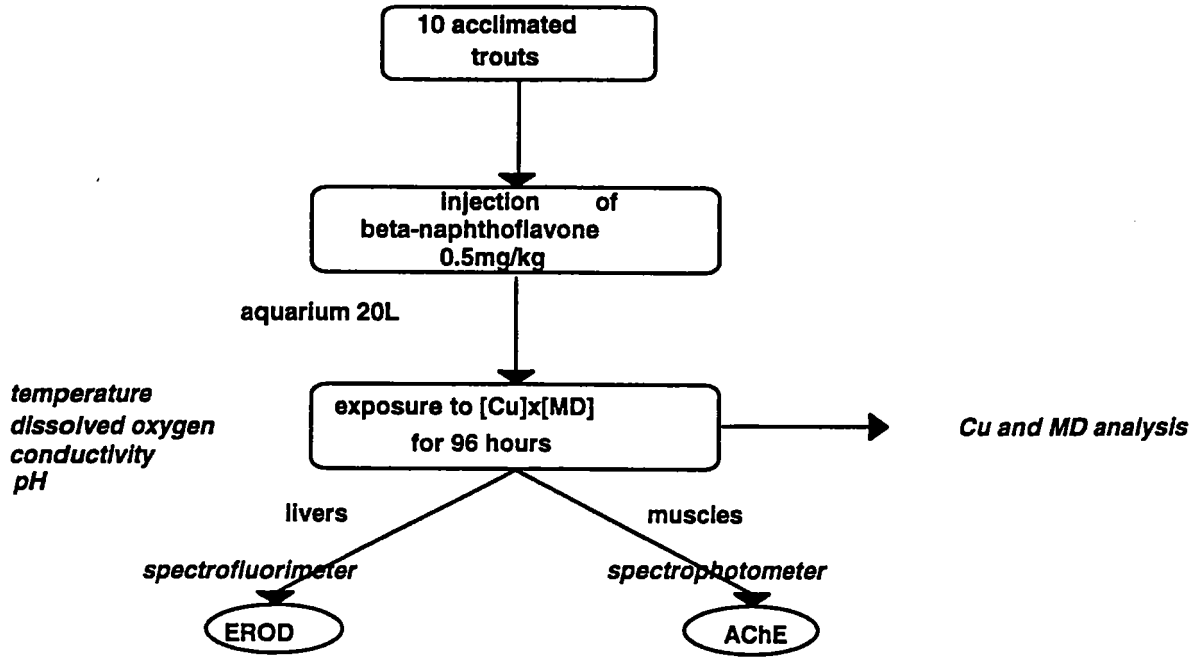


Figure 1. Experimental scheme.

EROD activities were measured using a spectrofluorimeter (Jobin Yvon JY3D) at 547 nm excitation wavelength and 585 nm emission wavelength.

AChE activity of the muscle S9 was measured according to Ellman et al. (1961): 1.75 mL tris 0.1 M pH 7.8, 50 µL DTNB 0.01 M, 50 µL S9 and 50 µL ATCI 0.1 M were successively added. AChE activities were determined spectrophotometrically (Uvikon 860 Kontron) at 405 nm.

Both enzymatic activities were reported on S9 protein concentrations which were measured by the method of Lowry et al. (1951) using a Sigma kit (procedure N° P5656).

Statistical procedures were performed using NCSS software (Number Cruncher Statistical System, Dr Jerry Hintze, Kaysville, Utah, USA) and Toxstat 3.0. (Gulley DD, Boelter AM, Bergman HL). Experimental data for EROD and AChE activities were log transformed to conform to the normality test (χ^2 test) and to the homogeneity of variance (Bartlett's test). All activities were compared by Student-t tests ($p<0.05$) and the general linear model ANOVA of the NCSS software was used to determine the influence of copper, methidathion and their interaction on the enzymatic activities.

RESULTS AND DISCUSSION

Copper or methidathion had no significant effect on basal EROD activity (3.5 ± 2.8). Pretreatement with ß-naphthoflavone resulted in 23-fold induction of EROD activity (Table 2).

Preliminary studies (unpublished data) had showed that the exposure of rainbow trout to 18 µg/L and more of copper led to a 55% decrease of EROD induction but did not affect AChE activity. After exposure to methidathion both a significant decrease (-39% at 1 µg/L) of EROD induction and a significant inhibition of AChE

activity (-70% at 5 µg/L) occured. Those results were confirmed by the present study (Tables 2 and 3).

Table 2. Joint effect of copper and methidathion on rainbow trout induced EROD activity (pmol of resorufin/min/mg of protein) (± standard deviation). Concentrations are nominal ones.

	EROD activity (pmol/min/mg protein)		
Concentrations	**0 µg Cu/L**	**8 µg Cu/L**	**18 µg Cu/L**
0 µg MD/L	82.2 ± 54.8	68.6 ± 40.0	51.1 ± 15.7
1 µg MD/L	75.9 ± 33.6	65.4 ± 18.2	52.6 ± 18.5
5 µg MD/L	31.9 ± 19.1*	21.6 ± 14.3*	25,1 ± 11.1*

* significantly different ($p<0.05$) from control.

Rainbow trout injected with ß-naphthoflavone and exposed to 18 µg/L of copper showed a 38% decrease of EROD activity but this was not significant ($p=0.19$). A decrease has already been observed with copper on the rat monooxygenase activities (Asokan et al. 1985). With cadmium, Fair (1986) reported a reduction of black sea bass benzo(a)pyrene (BaP) hydroxylase activity which had been previously induced by BaP.

EROD induction was significantly reduced (-61%) after exposure to 5 µg/L of methidathion ($p<0.05$). This could be due to a covalent binding of the oxon form (P=O) of the organophosphate (P=S) on the P450 protein leading to a decrease of the monooxygenase activities (Levi et al. 1988). Simon et al. (1984) found a reduction of the cytochrome P450 levels of carp exposed for 2 d to methidathion. To assess a possible effect of methidathion on the P450 synthesis, it would have been useful to measure the level of specific cytochrome P450 1A1 in our experiment.

In our study, only methidathion caused a significant ($p<0.05$) inhibition (-90% at 5 µg/L) of the AChE activity (Table 3): AChE activities of trout exposed to copper did not significantly differ from control group.

Table 3. Joint effect of copper and methidathion on rainbow trout AChE activity (nmol of ATCI hydrolyzed/min/mg of protein) (± standard deviation). Concentrations are nominal ones.

	AChE activity (nmol/min/mg protein)		
Concentrations	**0 µg Cu/L**	**8 µg Cu/L**	**18 µg Cu/L**
0 µg MD/L	261.2 ± 41.3	212.8 ± 72.4	252.3 ± 50.6
1 µg MD/L	203.1 ± 46.5*	208.5 ± 70.4	201.7 ± 81.2
5 µg MD/L	24.69 ± 16.74*	14.33 ± 10.35*	23.94 ± 14.44*

* significantly different ($p<0.05$) from control.

It is often considered that heavy metals inhibit AChE activity (Olson and Christensen 1980) and many surveys on several species in various experimental conditions show inhibition by copper (Nemcsok and Hugues 1988; Szabo et al. 1992). Inhibition was already observed in the serum of carp exposed for 96 hr to methidathion at 35% of the 96-hr LC50 (Szabo et al. 1992).

In our experimental conditions of joint exposure, an ANOVA analysis showed that copper ($p=0.04$) and methidathion ($p<0.01$) had an additive effect on the reduction of EROD induction: no interaction term could be identified as being a significant factor ($p=0.49$). Moreover, only methidathion ($p<0.01$) inhibited AChE activity. Copper ($p=0.18$) did not affect this inhibition and no interaction term was found ($p=0.14$).

Organophosphates need to be oxidized by monooxygenases to further inhibit AChE activity in vivo by phosphorylation (De Bruijn et al. 1993) and we artificially increased the natural metabolization capacity by injecting ß-naphthoflavone before exposing fish to methidathion. Thus the toxicity of methidathion could have been accentuated. In fact we found no difference between AChE activities of trout, injected or not with ß-naphthoflavone, and exposed to 5 µg/L of methidathion ($p=0.8$).

The present study shows that a joint exposure to copper and methidathion decreased the induced EROD activity. Exposure to copper leads to a decrease of EROD induction but methidathion has a more severe effect. Thus, in field conditions, detection of specific inducers of EROD activity might be hidden by simultaneous presence of such xenobiotics. Copper, at environmental concentrations, does not modify AChE inhibition by methidathion. As a consequence, methidathion can be detected even if copper is present. Freshwater fish EROD and AChE activities may be very useful to detect sublethal toxic pollution in the field but our study illustrates the need to clearly establish the limits of field use of those biomarkers. According to Goksoyr et al. (1991), it is of interest to measure the P450 levels by immunological techniques with a view to complementing the measurement of EROD activities in an environmental situation.

Acknowledgments. The authors wish to thank Professor P. VASSEUR for her constructive criticism and encouragment throughout the study which was granted by the French Ministry of Environment (DRAEI/93251). Thanks are also due to P. MORFIN for technical assistance, J.L. ROULIER for copper analysis and G. TOUSSAINT for methidathion determination.

REFERENCES

Asokan P, Das M, Dixit R, Mukhtar H (1985) Interaction of certain metal ions with aryl hydrocarbon hydroxylase of rat lung microsomes. Acta Pharmacol Toxicol 57:72-77

Bocquene G, Galgani F, Truquet Ph (1990) Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. Mar Environ Res 30:75-89

Brown VM, Shaw TL, Shurben DG (1974) Aspects of water quality and the toxicity of copper to rainbow trout. Wat Res 8:797-803

De Bruijn J, Seinen W, Hermens J (1993) Biotransformation of organophosphorous compounds by rainbow trout liver in relation to bioconcentration. Environ Toxicol Chem 12:1041-1050

Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol 7:88-95

Fair PH (1986) Interaction of benzo(a)pyrene and cadmium on GSH-S-transferase and benzo(a)pyrene hydroxylase in the black sea bass (*Centropristis striata*). Arch Environ Contam Toxicol 15:257-263

Gagne F, Blaise C (1993) Hepatic metallothionein level and mixed function oxidase activity in fingerling rainbow trout after acute exposure to pulp and papermill effluents. Wat Res 27:1669-1682

Goksoyr A, Larsen HE, Husoy AM (1991) Application of a cytochrome P450 IA1 ELISA in environmental monitoring and toxicological testing of fish. Comp Biochem Physiol 100C:157-160

Lemaire-Gony S, Lemaire P (1992) Interactive effects of cadmium and benzo(a)pyrene on cellular structure and biotransformation enzymes of the liver of the eel *Anguilla anguilla*. Aquat Toxicol 22:145-160

Levi PE, Hollingworth RM, Hodgson E (1988) Differences in oxidative dearylation and desulfuration of fenitrothion by cytochrome P-450 isoenzymes and in the subsequent inhibition of monooxygenase activity. Pestic Biochem Physiol 32:224-231

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenolreagent. J Biol Chem 193:265-275

Montgomery JH (1993) Agrochemicals desk references, Environmental data, Groundwater and Environmental Services Inc., Lewis Publishers, Eaton town, New Jersey

Nemcsok JG, Hugues GM (1988) The effect of copper sulphate on some biochemical parameters of rainbow trout. Envir Pollut 49:77-85

Olson DL, Christensen GM (1980) Effects of water pollutants and other chemicals on fish acetylcholinesterase (in vitro). Environ Res 21:327-335

Payne JF, Fancey LL, Rahimtula AD, Porter EL (1987) Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. Comp Biochem Physiol 86:223-245

Pohl RJ, Fouts JR (1980) A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. Analytic Biochem 107:150-155

Simon LM, Boross L, Nemcsok J (1984) Effects of herbicides on the cytochrome P-450 content of liver microsomes in carp (*Cyprinus carpio L*;). Acta Biol Szeged., 30:11-17

Sorensen EM (1991) Metal poisoning in fish. CRC Press, Inc., Florida, 374p

Szabo A, Nemcsok J, Asztalos B, Rakonczay Z, Kasa P, Hieu LH (1992) The effects of pesticides on carp (*Cyprinus carpio L.*) acetylcholinesterase and its biochemical characterization. Ecotoxicol Environ Safety 23:39-45

Article 7

FLAMMARION P., MIGEON B., URIOS S., MORFIN P. et J. GARRIC. Effect of Methidathion on the cytochrome P450 1A in the cyprinid fish gudgeon (*Gobio gobio*). *Aquatic Toxicology, soumis.*

Effect of Methidathion on the cytochrome P450 1A in the Cyprinid Fish Gudgeon (*Gobio gobio*)

Patrick Flammarion, Bernard Migeon, Sébastien Urios, Philippe Morfin, Jeanne Garric

Division Biologie des Ecosystèmes Aquatiques,
Cemagref, 3 bis Quai Chauveau 69336 Lyon cedex 9, France

Abstract

Effect of Methidathion (organophosphate) on the P450 1A induction was assessed both by measurements of the induction of the EROD activity and of the immunodetection of the CYP 1A protein in gudgeon. Fish were pretreated with 5mg/kg of bNF and exposed to environmental concentrations of Methidathion in laboratory. Methidathion proved to inhibit EROD induction *in vivo* and *in vitro*. In contrast, levels of immunoquantified CYP1A were found to be slightly higher in microsomes from fish exposed to 10-30 µg/L of methidathion than in control fish exposed to bNF alone. This suggests that the inhibition of the EROD activity by Methidathion resulted from a catalytic inhibition without decrease of the CYP1A protein.

Key words : Fish, EROD, inhibition, CYP1A

1. Introduction

Among biochemical biomarkers, cytochrome P450 1A dependent monooxygenase activity is one of the best studied parameters for measuring the response of water organisms to contaminants. CYP 1A can be specifically induced by hazardous chemicals such as PCBs, PAHs, PCDDs, PCDFs...Conversely, enzyme activity can be inhibited by higher concentrations of the inducer (Melancon and Lech, 1983) or by inhibitors (e.g. metals). Inhibition was observed in field studies (Monosson and Stegeman, 1991) as well as in laboratory conditions (George and Young, 1986 ; Fent and Stegeman, 1991 ; Flammarion et al., 1996 ; Stien et al., 1997).

Two different approaches may be used to quantify CYP1A induction : the measurement of the catalytic activity (e.g. EROD) and the immunodetection of the protein (Western blot, ELISA). Both methods should be used at the same time (Goksøyr and Husoy, 1992) ; the latter giving information when catalytic activity is inhibited (Huuskonen and Lindström-Seppä, 1995).

This work was carried out to increase the knowledge of such inhibition mecanisms using gudgeon (*Gobio gobio*), a common cyprinids, exposed to methidathion in laboratory conditions. This study complements earlier work : we showed that the joint exposure of rainbow trout to environmentaly relevant concentrations of copper and methidathion resulted in an additive decrease of the EROD induction (Flammarion et al., 1996). Yet, cyprinids, and gudgeon in particular, are more appropriate sentinel species than trout in rivers contaminated by pesticides. Besides, the measurement of the CYP1A protein might give additional information on the mecanism of inhibition. The objectives of this study were thus to verify the inhibition of the EROD induction by methidathion using a common cyprinid and to use both catalytic (using 7-ethoxyresorufin-O-deethylase activity (EROD)) and immunological measurements. In that case of organophosphate pesticide, additional measurement of the AChE activity (acetylcholinesterase) in muscle was done to compare the sensitivity of effects, specific (AChE) and non-specific (EROD).

2. Materials and methods

Chemicals

Methidathion (97%) was obtained from obtained from Cluzeau (Sainte Foy la Grande, France). 7-ethoxyresorufine, β-nicotinamide adenosine-diphosphate reduced (NADPH), β-naphthoflavone (βNF), Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), acetylthiocholine iodide, DTNB were purchased from Sigma Chemicals Co (St. Louis, MI, USA). Mouse anti-cod CYP1A IgG monoclonal antibodies, Mab NP-7 were obtained from Terra Miljølaboratorium AS (Bergen, Norway). All other chemicals were of the highest available commercial grade.

Laboratory handling and experiments

Gudgeon (*Gobio gobio*) (11.5±7.0 cm ; 15.9±3.7 g) were obtained 6 months before experiment from a local fish farm in central France (Mr C. Giraud, Fournols, France). Fish were held in dark tanks supplied with a 1.2 L/kg/min water flow rate (temperature = 17 ± 1 °C ; conductivity = 480 ± 10 µS/cm ; pH = 7.2 ± 0.2 ; dissolved oxygen = 8.5 ± 0.5 mg/L). Fish were fed Trouvit (Trouw, Fontaine-les-Vervins, France) at a rate of 1 % body weight a day. Feeding was stopped 24h prior to i.p. injection and prior to sacrifice. Fish were maintained on a 10:14-h dark:light photoperiod.

Immediately before the exposure, fish were intraperitoneally injected with 5 mg/kg of ß-naphthoflavone in corn oil in order to induce EROD activity to a level comparable to that of freshwater gudgeon exposed to environmental inducers. This dose leads to about 10 fold induction in gudgeon.

Then, groups of twenty gudgeon were exposed to continuous flow of methidathion (MD) for 96 hr. High levels of methidathion (organophosphate insecticide) are measured in a

French watershed covered by vineyards (Ardières, South-East of France). Methidathion is one of the more toxic organophosphates with a rainbow trout 96-hr LC50 = 10 µg/L (Montgomery 1993), a crayfish 96-hr LC50=280 µg/L (Cebrian et al., 1991). Experimental concentrations were chosen considering field concentrations (Ardières), acute toxicities, and sublethal concentrations obtained with gudgeon in a preliminary study (data not shown). MD was added from stock solutions to the continuously flowing dilution water to give the required concentrations. The stock solutions were prepared daily.

After fish sacrificed, liver, gonads and muscle were removed. Liver was rinsed in 150 mM KCl, homogenised in 100 mM phosphate buffer, pH 7.8 with 20% glycerol and PMSF, poured into 1.8 mL cryotubes. Liver homogenates and muscles were frozen in liquid nitrogen and kept for several days at -80°C before enzymatic assays. Gonadosomatic index (GSI) was calculated and expressed as the ratio of gonads weight to total body weight.

Methidathion analysis

MD was extracted from the water samples with dichloromethane (3x50mL) (Pestipur, SDS, Peypin, France) at pH 4. Samples in an final volume of 2 mL isooctane were analyzed using a Varian 3400 CX (Les Ulis, France) gas chromatograph equipped with an automatic injector and ECD detector. Gas vector was nitrogen. The GC was provided with a DB5 (JW Scientific, Folson, CA, USA) capillary column. Inlet, oven and detector temperatures were 250, 50-300, 300 respectively. An injection volume of 1 µl and a split ratio of 1 : 50 were used. Standard solution in isooctane (Pestipur, SDS, Peypin, France) was used with MD as external standard. The ECD signal was analyzed thanks to a STAR (Varian) software-package.

MD water concentrations were controlled twice the assay. The observed concentrations of MD were 10-20 % lower than the nominal ones (low stability of the MD to light).

EROD assay

Liver homogenates were thawed at 4 °C and centrifuged at 9,000 g. The supernatant (S9) was used for enzymatic assay performed at room temperature (20 ± 1 °C) by a modified Pohl and Fouts (1980) procedure on a 96-well microplate (Flammarion et al., in press). Enzymatic activities were reported on S9 protein concentrations measured by the method of Lowry et al. (1951).

Preparation of microsomal fractions

Just after the EROD dosage, S9 supernatants were pooled and centrifuged at 105 000 g for 1 hour at 4°C. The microsomal pellets were resuspended in homogenization buffer (100mM phosphate, pH 7.8, 1mM EDTA, 1mM DTT, 20% glycerol).

In vitro experiments

Microsomes from 4 bNF-induced gudgeon were pre-incubated with increasing concentrations of MD (from 10^{-10}M to 10^{-4}M, solubility in water about 10^{-3}M) prior to EROD determination. Copper, a known EROD inhibitor *in vitro*, with increasing concentrations (from 1.5 10^{-9}M to 10^{-3}M), was used as a positive control. After 30 min of pre-incubation, 7-ethoxyresorufin and NADPH were added to the incubation mixture and EROD activity was followed for 4 min. IC50 were estimated on percentages of control EROD activities by a non-linear estimation (logistic fitting) performed on EXCEL 5 solver. The confidence interval of the IC50 parameter was calculated by a bootstrap procedure (Efron, 1981).

Western blotting

SDS-PAGE gels (10% polyacrylamide) were performed according to Laemmli (1970). Proteins from gudgeon microsomes were transferred to nitrocellulose membrane and immunodetected using enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Life Sciences) with a mouse anti-cod CYP1A monoclonal antibody (Biosense Laboratories, Bergen, Norway) at a 1/200 dilution and a anti-mouse horseradish peroxidase-linked secondary antibody (Amersham Life science) at a 1/1000 dilution. The bound HRP catalyzes an enhanced chemiluminescent reaction producing light captured on film (1 min exposure, Kodak Biomax film). Image recording and processing was performed by Visilog 4.1 (Noesis, France).

AChE assay

Prior to AChE assay the muscle was homogenized in Phosphate buffer 0.1 M pH 7.8. Each muscle homogenate was centrifuged at 9,000 g and the supernatant (S9) was used for enzymatic assays. AChE activity of the S9 was measured at 405nm by a modified Ellman et al. (1961) procedure on a 96-well microplate (IEMS, Labsystems, France) : Phosphate 0.1 M pH 7.8, 0.2mM DTNB and 2mM ATCI. Enzymatic activities were reported on S9 protein concentrations (method of Lowry et al. (1951)).

Data analysis

Statistica software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, US) was used for all statistical analyses. EROD and AChE data were Log-transformed to conform to the normality test (χ^2 test for normality) and to the homogeneity of variance (Levene's test). Geometric mean give then reliable position parameters. Groups were compared by t-tests. All levels of significance were α=0.05, except where otherwise noted. The 95% confidence intervals (95% CI) were calculated using the critical values of Student's t-distributions. Fish groups were with 7-10 individuals.

3. Results

EROD results in vivo

Methidathion had no significant effect on basal EROD activity (data not shown). In contrast, the exposure of gudgeon to MD lead to a 60-70 % decrease of the EROD induction when fish had been pre-treated with bNF (Table 1). However, this decrease was significant only with males (ANOVA, $p<0.01$). With females (ANOVA, $p=0.38$), in spite of a similar decrease, a great variability of EROD activities, probably due to the sexual maturation (female had high GSI, data not shown), might have reduced the significativity of the effect.

EROD results in vitro

MD had a poor effect on EROD activity *in vitro* (Fig. 1). A decrease was only observed at the highest MD concentration (10^{-4}M, 20mg/L) which is almost the 10% solubility of MD in water. An IC_{50} would be estimated by 6.6 10^{-5}M (4.7 10^{-5}M ; 9.1 10^{-5}M). In contrast, copper was a more potent inhibitor with an estimated IC_{50} of 1.0 10^{-5}M (0.8 10^{-5}M ; 1.5 10^{-5}M) or 0.6 mg Cu/L.

Complementary information provided by the immunodetection of CYP1A protein

No immunoreacting band could be detected with control fish (Fig. 2). In contrast an intense band was observed with fish treated with 50mg/kg. Although less intense, CYP1A band could be seen with 5mg/kg treatment alone or with MD exposure after pretreatment. More, no inhibition was found but a slight increase in band intensities (lanes f and g).

AChE results

AChE inhibition could be observed from 3µg/L of MD in the gudgeon muscle with both female and male (sexual difference was not significant whatever the treatment)(Fig. 3).

4. Discussion

In an earlier study, we found that MD was an inhibitor of the EROD induction in rainbow trout (Flammarion et al., 1996) resulting in 60% decrease at 5µg/L when trout had been pre-treated with 0.5 mg/kg of bNF (resulting in 10-30 times of induction). An higher dose of bNF (5mg/kg) was necessary to induce the EROD activity in gudgeon to a similar level. Gudgeon was also less sensible to MD than trout since the EROD induction was reduced (-63% for both female and male) after exposure to 30 µg/L of methidathion.

Such inhibition phenomenon with organophosphates was particularly studied with parathion. In the oxidation step of organophosphorous esters to the oxon forms, elemental sulphur is released and may further inhibit monooxygenases by a covalent binding « self-killing reaction » (Norman et al., 1974 ; Kamataki and Neal, 1976 ; Morelli and Nakatsugawa,

1978 ; Levi et al., 1988). In addition, Morelli and Nakatsugawa (1978) established that the inhibition of rat liver microsomal oxidases during the oxidative metabolism *in vitro* of parathion was essentially an irreversible inactivation. Such binding leads to cross-linking of the proteins to form high molecular weight complexes (Kamataki and Neal, 1976) which can be dissociated by treatment with dithiothreitol or beta-mercaptoethanol.

With Methidathion, fewer studies were carried on. Simon et al. (1984) found a reduction of the cytochrome P450 levels of carp exposed for 2 d to methidathion. In addition to the *in vivo* EROD experiment we examinated the effect of MD on microsomes *in vitro* and assessed the possible effect of methidathion on the P450 synthesis thanks to the CYP1A immunodetection.

The inhibition of EROD activity *in vitro* was observed only at the highest concentrations of MD (20 mg/L) while copper, with an effect at 0.1-1 mg/L, was confirmed as a more potent inhibitor as already described (Stien et al., 1997).

The immunoquantification of the CYP1A did not confirm the results with the EROD determination. No inhibition could be observed which is in agreement with the mecanism of the parathion. Yet, the potential activation should be confirmed by additional experiments. Such phenomenon has yet been already observed : Snegaroff et al., 1989, when exposed trout to chloramphenicol, observed an inhibition step for 8 days followed by an activation up to 21 days. However, in our work, the effect of MD was only assessed after a 4 day exposure and would need studies at different durations of exposure to provide a complete analysis of the MD mecanism *in vivo*.

The specific inhibition of the AChE activity in gudgeon muscle was detected from 3µg/L. This is in agreement with earlier studies : AChE activity in the brain and liver of carp was strongly inhibited (-90%) by a 24-hr treatment of 2mg/L of MD (36% 96-hr LC50) (Nemcsok et al., 1990). These authors suggested that MD not only blocks the active center of the enzyme but also inhibits the *de novo* synthesis.

Besides, this is the oxon form of the organophosphate that inhibits the AChE activity (De Bruijn et al., 1991). As the oxon is also supposed to inhibit the EROD activity, we looked for a correlation between EROD and AChE levels in each exposure to MD. Yet, no significant relationship was found. This stresses on the complexity of such mecanisms.

We observed that fish exposed to 30 µg/l of MD lost their appetite. This was already observed with rainbow trouts exposed to 5µg/l of MD. At those upper concentrations, we also observed loss of equilibrium and trouble in swimming, which corresponds to the pattern of response of fish to chemicals with a narcotic action (De Bruijn et al., 1991). Then, the inhibition of the EROD activity could also have resulted from a global toxic response. A decrease in the CYP1A protein would then have occurred at higher concentrations of exposure. The specific measurement of the AChE inhibition confirmed its interest with the lowest concentrations with which no other effect could have been detected.

5. Conclusion

An inhibitory effect of MD was observed *in vivo* and *in vitro* on the EROD induction in gudgeon. Immunoquantification of the CYP1A protein showed that the mecanism was a catalytic inhibition which confirms the interest of the immunochemical measurement in detecting induction by PAHs and PCBs in the environment even though catalytic inhibitors are present. Nevertheless, the measurement of the AChE inhibition proved to be much more sensitive in that case of organophosphate pesticide. This points out that a biomonitoring program cannot tackle the presence of mixtures of pollutants with a sole biomarker and that complementary measurements (specific and non-specific) are necessary.

Acknowledgements

This work was supported in part by the GIP Hydrosystèmes Program of the French Ministry of Environment. Chemical analyses were performed at the Laboratoire des micropolluants du Cemagref (France) by C. Garon-Boucher and B Laillet. We would also wish to thank H. Fenet, M. Lafaurie and X. Stien for their generous help in the learning of the immunodetection procedure.

References

Cebrian, C., E. Andreu, M.D. Ferrando and A. Fernandez-Casalderrey (1991) Degradation and acute toxicity of methidathion and trichlorfon on *Procambarus clarkii*, in experimental conditions. Toxicol. Environ. Chem. 31-32, 312-327.

De Bruijn, J., E. Yedema., W. Seinen and J. Hermens (1991) Lethal body burdens of four organophosphorous pesticides in the guppy (*Poecilia reticulata*). Aquat. Toxicol. 20, 111-122.

Efron, B. (1981) Nonparametric estimates of standard error : the jackknife, the bootstrap and other methods. Biometrika, 68, 589-599.

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

Fent, K. and J.J. Stegeman (1991) Effects of tributyltin chloride *in vitro* on the hepatic microsomal monooxygenase system in the fish *Stenotomus chrysops*. Aquat. Toxicol. 20, 159-168.

Flammarion, P., B. Migeon and J. Garric (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., B. Migeon and J. Garric. Statistical analysis of cyprinids EROD data in a large French watershed. Ecotoxicol. Environ. Safety, in press.

George, S.G. and P. Young (1986). The time course of effect of cadmium and 3-methylcholanthrene on activities of enzymes on xenobiotic metabolism and metallothionein levels in the plaice, *Pleuronectes platessa*. Comp. Biochem. Physiol. 83C, 37-44.

Goksøyr, A. and A.M. Husoy (1992) The cytochrome P450 1A1 response in fish : Application of immunodetection in environmental monitoring and toxicological testing. Mar. Environ. Res. 34, 147-150.

Huuskonen, S. and P. Lindström-Seppä (1995) Hepatic cytochrome P4501A and other biotransformation activities in perch (*Perca fluviatilis*) : the effects of unbleached pulp mill effluents. Aquat. Toxicol. 31, 27-41.

Kamataki, T. and R.A. Neal (1976) Metabolism of diethyl p-nitrophenyl phosphorothionate (parathion) by a reconstituted mixed-function oxidase enzyme system: studies of the covalent binding of the sulfur atom. Molecular Pharmacol. 12, 933-944.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature (Lond.) 227, 680-685.

Levi, P.E., R.M. Hollingworth and E. Hodgson (1988) Differences in oxidative dearylation and desulfuration of fenitrothion by cytochrome P-450 isozymes and in the subsequent inhibition of monooxygenase activity. Pesticide Biochem. Physiol. 32, 224-231.

Lowry, O. H, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenolreagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

Melancon, M.J. and J.J. Lech (1983) Dose-effects relationship for induction of hepatic monooxygenase activity in rainbow trout and carp by aroclor 1254. Aquat. Toxicol. 4, 51-61.

Monosson, E. and J.J. Stegeman (1991) Cytochrome P450E (P450IA) induction and inhibition in winter flounder by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl : comparison of response in fish from Georges Bank and Narragansett Bay. Environ. Toxicol. Chem. 10, 765-774.

Montgomery, J.H. (1993) Agrochemicals desk references, Environmental data, Groundwater and Environmental Services Inc., Lewis Publishers, Eaton town, New Jersey.

Morelli, M.A. and T. Nakatsugawa (1978) Inactivation *in vitro* of microsomal oxidases during parathion metabolism. Biochem. Pharmacol. 27, 293-299.

Nemcsok, J., Z. Rakonczay, P. Kasa, B. Asztalos and A. Szabo (1990) Effects of methidathion on distribution of molecular forms of acetylcholinesterase in Carp, as revealed by density gradient centrifugation. Pesticide Biochem. Physiol. 37, 140-144.

Norman, B.J., R.E. Poore and R.A. Neal (1974) Studies of the binding of sulfur released in the mixed-function oxidase-catalysed metabolism of diethyl p-nitrophenyl phosphorothionate (parathion) ti diethyl p-nitrophenyl phosphate (paraoxon). Biochem. Pharmacol. 23, 1733-1744.

Pohl, R.J. and J.R. Fouts (1980) A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. Analytical Biochem. 107, 150-155.

Simon, L.M., L. Boross and J. Nemcsok (1984) Effects of herbicides on the cytochrome p-450 content of liver microsomes in Carp (*Cyprinus carpio* L.). Acta Biol. Szeged., 30, 11-17.

Snegaroff, J., J. Bach and V. Prevost (1989) Effects of chloramphenicol on hepatic cytochrome P-450 in rainbow trout. Comp. Biochem. Physiol. 94C, 215-222.

Stien, X., C. Risso, M. Gnassia-Barelli, M. Romeo and M. Lafaurie (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.

Table 1. EROD activities in gudgeon exposed to increasing concentrations of methidathion (MD) after a pre-treatment with 5mg/kg of bNF. Geometric means are given with CI95 in parentheses.

p : probabilities from t'tests between MD exposed and induced control fish.

Treatment		Female		Male	
		EROD	**p**	**EROD**	**p**
Control		3 (2 ; 7) (N=10)		10 (5 ; 21) (N=10)	
Induced control		33 (11 ; 95) (N=10)		153 (95 ; 244) (N=9)	
MD	3 µg/L	25 (9 ; 71) (N=8)	0.71	105 (66 ; 168) (N=10)	0.22
	10 µg/l	17 (6 ; 47) (N=6)	0.40	97 (77 ; 122) (N=10)	0.07
	30 µg/l	12 (5 ; 27) (N=10)	0.10	58 (38 ; 90) (N=9)	<0.01

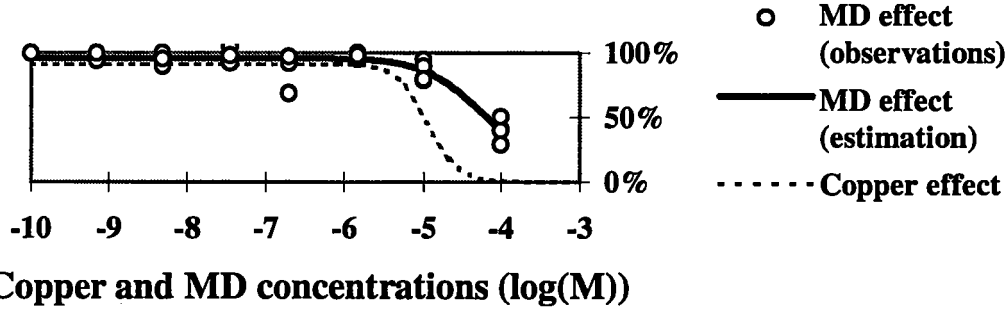


Fig. 1. Inhibition of the EROD activity by Methidathion (MD) *in vitro* with induced microsomes of gudgeon. Copper was chosen as a potent inhibitor.

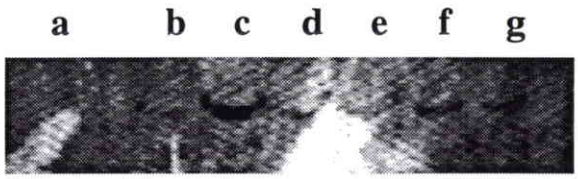


Fig. 2. P450 1A immunoblot analysis of male gudgeon of hepatic microsomes using Mab anti-cod. Micosomal proteins (50 µg protein per lane) were loaded as indicated :

Lane a through c : 0 ; 5 ; 50 mg bNF/kg

Lane d through g : 0 ; 3 ; 10 ; 30 µg MD/L after 5 mg bNF/kg pre-treatment.

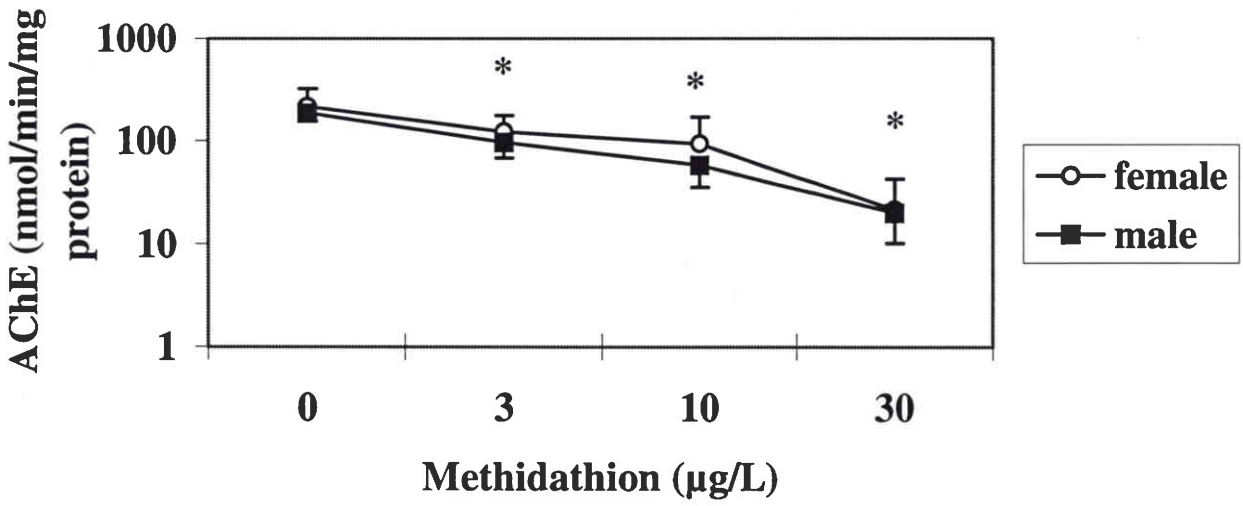


Fig. 3. Inhibition of the AChE activity in gudgeon by Methidathion *in vivo*.

Article 8

DEVAUX A., FLAMMARION P., BERNARDON V., GARRIC J. et G. MONOD. Monitoring of the chemical pollution of the river Rhône through measurement of DNA damage and cytochrome P4501A induction in chub (*Leuciscus cephalus*). *Marine Environmental Research, sous presse.*

MONITORING OF THE CHEMICAL POLLUTION OF THE RIVER RHÔNE THROUGH MEASUREMENT OF DNA DAMAGE AND CYTOCHROME P4501A INDUCTION IN CHUB (*LEUCISCUS CEPHALUS*)

A Devaux[1,3], P Flammarion[2], V Bernardon[1], J Garric[2] and G Monod[3]
[1]Laboratoire des Sciences de l'Environnement, ENTPE, rue Maurice Audin 69518 Vaulx en Velin Cedex, France
[2]Laboratoire d'Ecotoxicologie, Cemagref, 3 bis quai Chauveau 69336 Lyon Cedex 9, France
[3]INRA, Unité d'Ecotoxicologie aquatique, IFR Biologie et Ecologie du Poisson, 65 rue de Saint-Brieuc 35042 Rennes Cedex, France

ABSTRACT

The in vivo response of freshwater fish exposed to pollutants was assessed using two biomarkers, 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) induction and DNA single strand breaks. Chub (Leuciscus cephalus) were caught in spring and in fall at various locations in the river Rhône watershed. EROD activity was measured in the liver while DNA damage was evaluated in chub erythrocytes using the recently developped Comet assay. Chemical contamination was evaluated both in fish muscle (PCBs) and in sediment (PCBs, PAHs, heavy metals) collected at each sampling station. Sex of individuals was shown to influence the level of EROD activity but not the level of DNA damage. The EROD activity as well as the DNA damage were found to be higher in the mostly contaminated stations compared to the reference one. This study shows that multibiomarker-based approach provides complementary informations about early effects in feral fish exposed to complex chemical pollution and highlights the interest of the Comet assay in genotoxicity assessment.

In the field, chemical pollution often occurs as a complex mixture, in particular in aquatic ecosystems. This makes the prediction of the resulting effects rather difficult and requires the study of multiple biological endpoints referred as biomarkers in the exposed organisms (Adams *et al.*, 1990). The measure of cytochrome P450-dependent enzymatic activities and DNA damages in fish exposed to xenobiotics have been proved to be a powerful way to monitor pollution effects (Goksøyr and Förlin, 1992 ; De Flora *et al.*, 1993).

The main objective of the present study was to evaluate the applicability of a newly developped genotoxicity assay, i.e. the Comet assay, in assessing the level of DNA damage in feral fish living in polluted areas, in addition to the measure of the well-known CYP1A-dependent 7-ethoxyresorufin *O*-deethylase (EROD) activity.

Chub (*Leuciscus cephalus*) were caught by electrofishing both in spring (spawning period) and in fall in one station of the river Ain considered as a reference site (station 1) and in two stations of the river Rhône located in an industrial area (stations 2 and 3) (Fig.1). After being captured, fish were immediately sacrificed and blood was collected in heparinized syringe via

caudal vein puncture and kept at 4°C for one day before processing the Comet assay. Fish were weighed, measured and liver and gonads were removed and weighed. Liver homogenates were prepared as previously described, frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C before enzymatic assay (Flammarion *et al.*, 1997). EROD activity was measured on 10,000g supernatants according to a modified Pohl and Fouts (1980) procedure on a 96-well microplate (Flammarion *et al.*, 1997). Three replicates of each fish liver homogenate were incubated in the plate reader leading to a 3 % coefficient of variation among replicates. Comet assay was performed on fish erythrocytes following the initial procedure of Singh *et al.* (1988) and modified according to Devaux *et al.* (1997). DNA damage was expressed as a tail moment value defined by Olive *et al.* (1990) using an image analysis computerized method (Kinetic Imaging Ltd). Sediment was collected once in the three sites and was analyzed as well as fish muscle for 132 compounds (EEC 76/464) including PCBs, organochlorine pesticides, PAHs and heavy metals (Flammarion *et al.*, 1997). EROD activities were Log-transformed and compared by *t*-test ($p<0.05$). Tail moment values were compared by the nonparametric Mann-Whitney *U*-test ($p<0.05$).

EROD activity remained significantly higher in male than in female livers for the 3 stations in spring but not in fall. In contrast, DNA primary damage measured through the tail moment in the Comet assay was not influenced by sex of fish whatever the station or the season (Table 1). Several cytochrome P450-dependent activities are known to be under hormonal control in fish, in particular the EROD activity (for a review, see Andersson and Förlin, 1992). Thus, according to the sexual development in chub (quantified by GSI), difference in hormonal status between sexes could have accounted for the sexual dimorphism in EROD activity level. In this study, lack of differential DNA damage between sexes is difficult to analyse since literature data about the involvement of sex in regulation of DNA primary damage like DNA single strand breaks remain scarce and controversial.

EROD activity was generally higher in fish caught at stations 2 and 3 compared to the station 1. Among the potential EROD inducers analysed, only PCBs were found at higher concentrations both in fish muscle and sediment from stations 2 and 3 compared to the station 1 (Table 1). Differences in hepatic EROD induction could be due in part to differential PCB contamination, thus confirming the results obtained in the river Rhône by Monod *et al.* (1988) in other cyprinid species.

Fish caught at stations 2 and 3 exhibited significantly higher tail moment compared to the station 1 at both seasons but no correlation was observed between EROD activity and DNA damage levels (data not shown). Sediment of the river Rhône exhibited higher levels of cadmium than sediment of the river Ain (Table 1). Mutagenic properties of PCBs are still controversial and one of the most toxic planar PCBs, i.e. 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl has been recently shown to fail to induce *in vitro* single strand breaks in trout erythrocytes (Belpaeme *et al.*, 1996). Since heavy metals like chromium and cadmium have been clearly

identified as DNA strand break inducers (Clayson *et al.*, 1994), they could have contributed to enhance DNA single strand break level in erythrocytes of fish living in the river Rhône.

In order to substantiate the involvement of chemicals in the observed biomarker responses, hepatic EROD activity and DNA damage level in erythrocytes were followed in immature fish (30g average weight) caught in fall in the station 3 and kept for 2 months in clean water in laboratory conditions. Both parameters exhibited a constant decrease along the time that reached after 2 months 70 and 87% of the 1 day-value for EROD activity and tail moment respectively (Fig.2). These results should likely be due to elimination of xenobiotics responsible for biomarker responses. Decrease in DNA damage is in accordance with that measured by Pandrangi *et al.* (1995) in erythrocytes of carp and bullheads caught in areas contaminated by PCBs and further maintained in dechlorinated tap water. Authors showed that the level of DNA damage dropped to control values after 3 months and suggested the possibility of a complete turnover of fish erythrocytes after 3 months to be responsible of the observed reduction in DNA damage. Since our results show that decrease in DNA damage reached as much as 50 % of the initial value after 2 weeks, the role of DNA repair, in addition to erythrocyte turnover, can not be excluded.

As a conclusion, this work demonstrates the interest of a multibiomarker-based approach and shows Comet assay as a valuable technique for the assessment of genotoxicity in aquatic species exposed to complex mixture of xenobiotics.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by the GIP Hydrosystèmes, the Compagnie Nationale du Rhône and the Agence de l'Eau Rhône Méditerranée Corse (France). The authors are very much indebted to Marc Bray, Bernard Migeon and Pascal Roger (Cemagref, France) for excellent technical assistance.

REFERENCES

Adams, S. M., Shugart, L. R., Southworth, G. R. & Hinton, D. E. (1990). In *Biomarkers of Environmental Contamination*, ed. J.F. Mc Carthy & L.R. Shugart. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 333-353.

Andersson, T. & Förlin, L. (1992). *Aquat. Toxicol.* **24**, 1-20.

Belpaeme, K., Delbeke, K., Zhu, L. & Kirsch-Volders, M. (1996). *Mutagenesis* **11**, 485-492.

Clayson, D. B., Mehta, R. & Iverson, F. (1994). *Mutat. Res.* **317**, 25-42.

DeFlora, S., Vigano, L., D'Agostini, F., Camoirano, A., Bagnasco, M., Bennicelli, C., Melodia, F. & Arillo, A. (1993). *Mutat. Res.* **319**, 167-177.

Devaux, A., Pesonen, M. & Monod, G. (1997). *Toxicol. in Vitro* (in press).

Flammarion, P., Migeon, B. & Garric, J. (1997). *Ecotox. Environ. Safety* (in press).

Goksoyr, A. & Förlin, L. (1992). *Aquat. Toxicol.* **22**, 287-312.

Monod, G., Devaux, A. & Rivière, J.-L. (1988). *Science Total. Environ.* **73**, 189-201.

Olive, P. L., Banath, J. P. & Durand, R. E. (1990). *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 779-783.

Pandrangi, R., Petras, M., Ralph, S. & Vrzoc, M. (1995). *Environ. Molec. Mutagenesis* **26**, 345-356.

Pohl R.J. & Fouts J.R. (1980). *Analytical Biochem.* **107**, 150-155.

Singh, N. P., McCoy, T., Tice, R. R. & Schneider, E. L. (1988). *Exp. Cell Res.* **175**, 184-191.

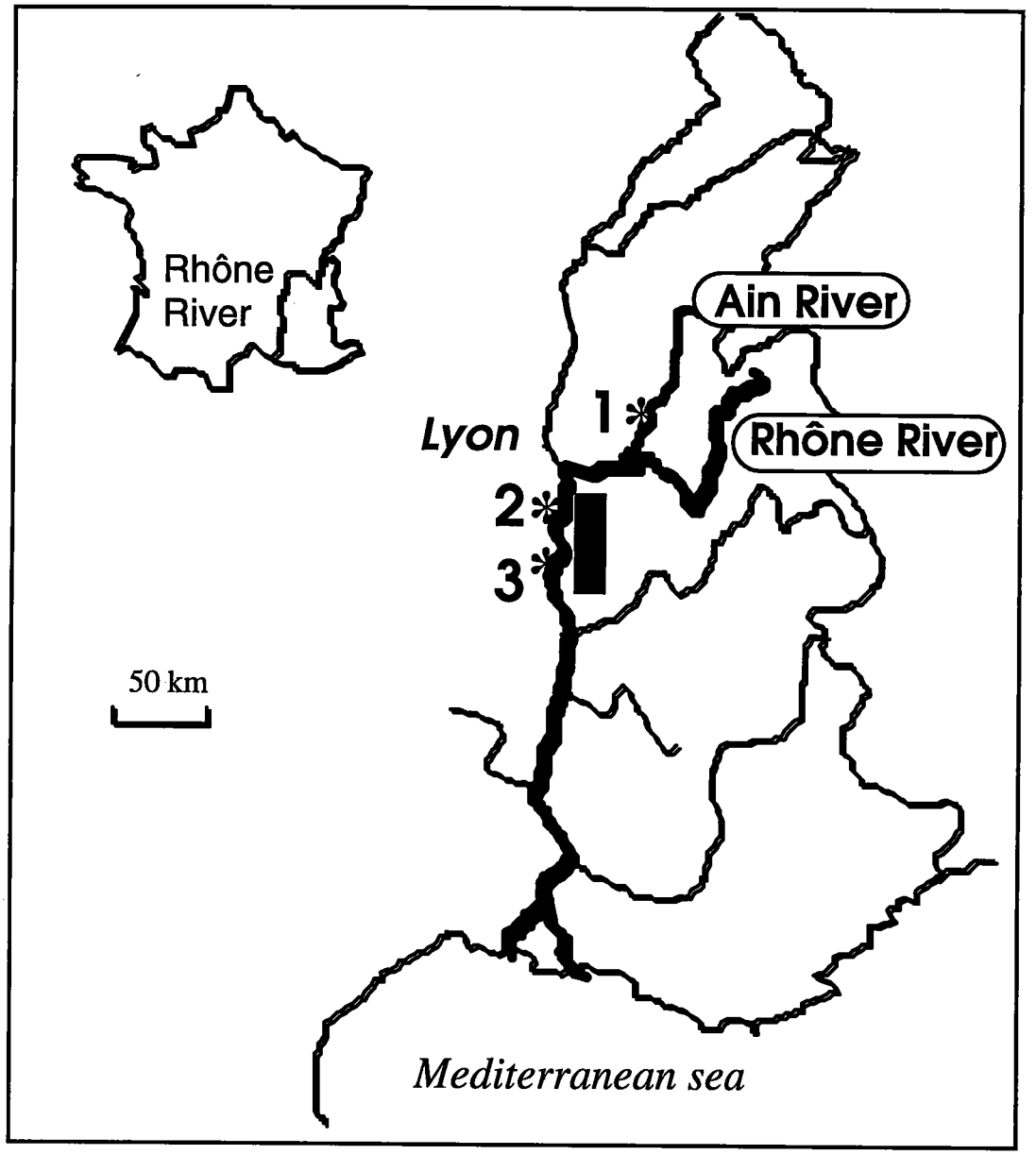
Figure 1. Map showing location of sampling sites along Ain and Rhône Rivers.

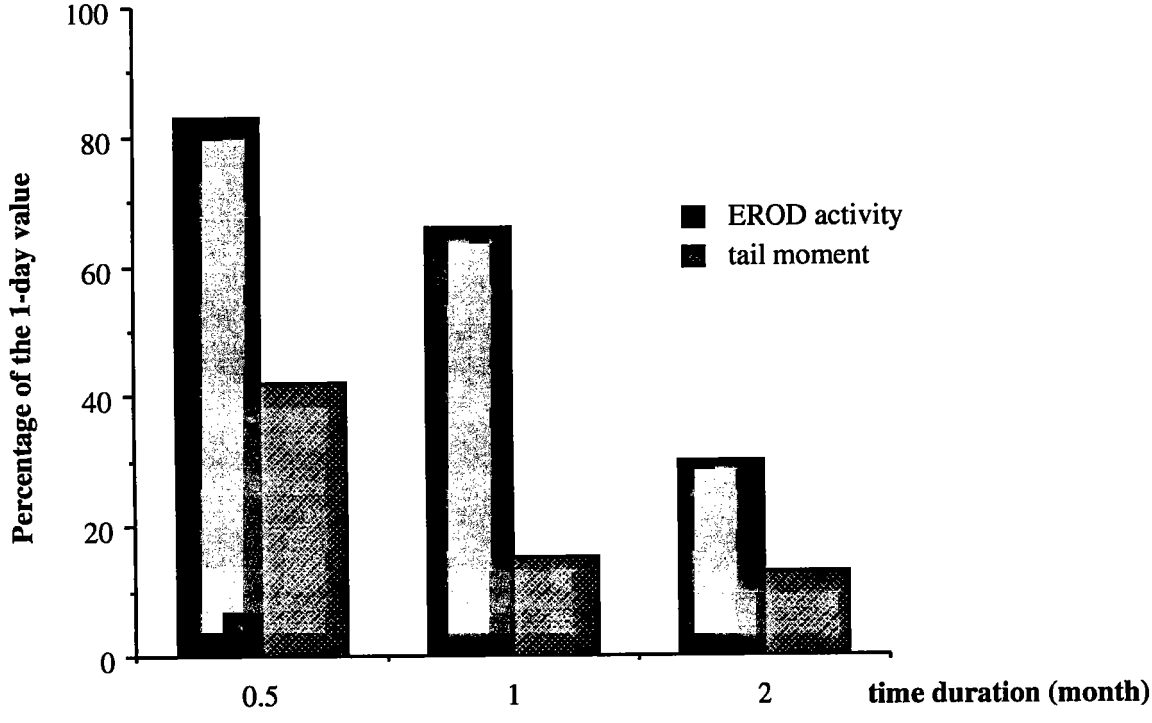
Figure 2. EROD activity and DNA damage measurement in chub maintained in the laboratory for 2 months.
One-day EROD activity and tail moment were respectively 69 pmol/min/mg protein and 27 µm.

Table 1. Hepatic EROD activity and DNA damage in erythrocytes of chub from sampling sites of rivers Ain and Rhône.
*Gonadosomatic index (GSI) was calculated as 100 x gonad weight / body weight.
EROD specific activity (pmol/min/mg protein) was expressed as the geometric mean considering its logarithmic distribution. Statistical analyses were done on Log-transformed data for the EROD activity.
Since no differences were shown between the tail moment values measured in male (M) and female (F) fish, results were given as mean of pooled data.

[a] significantly different from the corresponding female value ($p<0.05$).

[b] significantly different from the corresponding station 1 value ($p<0.05$).


Rhône
River
Ain River
Lyon
1
Rhône River
2
3
50 km
Mediterranean sea


100
80
60
40
20
0
Percentage of the 1-day value
EROD activity
tail moment
0.5
1
2
time duration (month)

Station		1		2		3	
Season		Spring	Fall	Spring	Fall	Spring	Fall
GSI* mean ± SD (number of fish)	F	9.3 ± 4.7 (8)	2.2 ± 0.3 (4)	4.3 ± 0.5 (7)	1.3 ± 1.2 (8)	8.4 ± 2.4 (9)	1.0 ± 0.3 (10)
	M	4.4 ± 0.7 (4)	2.6 ± 2.6 (7)	4.1 ± 0.6 (4)	0.9 ± 0.2 (8)	3.7 ± 1.3 (3)	0.6 ± 0.1 (5)
EROD activity geometric mean (confidence intervals 95 %)	F	3 (1; 5)	3 (2; 4)	6 (1; 18)	12 (5; 23)^{b}	20 (8; 47)^{b}	32 (23; 44)^{b}
	M	8 (3; 19)^{a}	7 (3; 13)^{a}	26 (7; 78)^{a,b}	18 (10; 30)^{b}	310 (150; 630)^{a,b}	30 (9; 95)^{b}
Comet tail moment (mean ± SD)		8.9 ± 4.3	16.5 ± 9.1	23.1 ± 19.3^{b}	44.7 ± 44.6^{b}	18.7 ± 13.6^{b}	31.0 ± 11.1^{b}
PCB concentration							
Fish muscle (µg Aroclor 1254/kg lipid weight)		1,2		7,8		26,6	
Sediment (mg Aroclor 1254/kg dry weight)		ND		0,145		0,308	
Cadmium concentration of sediment (mg/kg dry weight)		ND		2		1,6	
Chromium concentration of sediment (mg/kg dry weight)		44,4		68,3		46,0	