



HAL
open science

**Mise en évidence et validation de biomarqueurs
écotoxicologiques dans la population d'anguilles d'un
étang de la réserve naturelle nationale de Camargue, le
Vaccarès, exposée à des polluants organiques persistants**

Hélène Roche, Astrid Buet, Francois Ramade

► **To cite this version:**

Hélène Roche, Astrid Buet, Francois Ramade. Mise en évidence et validation de biomarqueurs écotoxicologiques dans la population d'anguilles d'un étang de la réserve naturelle nationale de Camargue, le Vaccarès, exposée à des polluants organiques persistants. *Revue d'Écologie*, 2003, 58 (1), pp.127-141. hal-03530067

HAL Id: hal-03530067

<https://hal.science/hal-03530067>

Submitted on 17 Jan 2022

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.



MISE EN ÉVIDENCE ET VALIDATION DE BIOMARQUEURS
ÉCOTOXICOLOGIQUES DANS LA POPULATION D'ANGUILLES
D'UN ÉTANG DE LA RÉSERVE NATURELLE NATIONALE DE CAMARGUE,
LE VACCARÈS, EXPOSÉE À DES POLLUANTS ORGANIQUES PERSISTANTS

Hélène ROCHE¹, Astrid BUET¹ & François RAMADE¹

SUMMARY

Though located in a rather remote area free from neighbouring industrial activities, the French National Nature Reserve of Camargue is however exposed to a non point source contamination by a number of persistent organic pollutants, particularly polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and organochlorine compounds (OC). Due to the nature of this contamination, investigations about validation of biomarkers in the eels of the Vaccarès lagoon have proven to be of the utmost importance. They have been focused on the characterization and validation of biomarkers related to metabolic responses including, not only the detoxification mechanisms (biotransformation, antioxidant process) and the energy requirements, but also some unspecific metabolic processes. These last ones are enzymatic membrane markers implicated either in the neuronal conduction (acetylcholinesterase, AChE) or in the osmoregulation and the energy metabolism (ATPases). The experimental results have been screened by the way of a multivariate analysis. It may be concluded that the rate of tissue glycogen seems to be a sensitive biomarker as well as three hepatic activities involved in the protection against oxyradicals : catalase, glutathion peroxidase (SeGPx) and superoxide dismutases (SOD). The muscle and gill ATPases as well as the muscle and brain AChE show more significant results in term of biomarkers than the biotransformation enzymes : ethoxyresorufine-*O*-deethylase (EROD) and uridine diphospho-glucuronyl transferase (UDPGT). However most of these enzymatic activities depend on a number of abiotic factors. This study brings some conclusive elements for the validation of the biomarkers use from data obtained in laboratory studies to their application in field ecotoxicology. It also raises the question about the tissue location of the contaminant in fish, in relationship to their age or their mode of contamination, and its influence on the biomarkers response. As a conclusion, if the validation of membrane indicators is confirmed, this study, by its innovative approach, provides the first statement on the extent of the ecotoxicological threat for the aquatic species in a protected area, stemming from the occurrence of persistent organic pollutants (POP) in the cell membranes.

RÉSUMÉ

Bien que située dans une zone assez isolée du delta du Rhône et de ce fait exempte de toute activité industrielle, la Réserve Naturelle Nationale de Camargue n'en est pas moins

¹ Écologie et Zoologie, CNRS UPRESA 8079, Écologie, Systématique et Évolution, Bât. 442, Université Paris-Sud XI, F 91405 Orsay cedex. E-mail : helene.roche@ibaic.u-psud.fr



exposée à une contamination diffuse par divers polluants organiques persistants, parmi lesquels des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et des composés organochlorés (OC). En raison des particularités de cette contamination, la recherche de biomarqueurs chez les anguilles du Vaccarès se sont orientées vers une analyse multi-paramétrique qui s'intéresse à des réponses métaboliques incluant non seulement les mécanismes de détoxification (biotransformation, antioxydant) et les besoins énergétiques, mais aussi d'autres processus métaboliques « aspécifiques ». Il s'agit de marqueurs enzymatiques membranaires dont certains ont un rôle dans la conduction neuronale (acétylcholinestérase, AChE), dans l'osmorégulation, et/ou dans le métabolisme énergétique (ATPases). A l'issue de ces travaux le taux de glycogène tissulaire s'avère être un marqueur sensible ainsi que trois activités enzymatiques hépatiques impliquées dans la défense contre les espèces réactives de l'oxygène : catalase, glutathion peroxydase (SeGPx) et superoxyde dismutases, (SOD). Par ailleurs les ATPases musculaires et branchiales et l'AChE musculaire et cérébrale présentent une plus grande significativité, en termes de biomarqueurs, que les enzymes de biotransformation éthoxyrésorufine-*O*-dééthylase (EROD) et uridine diphospho-glucuronyl transférase (UDPGT). Cependant la plupart de ces activités enzymatiques sont dépendantes d'un certain nombre de facteurs abiotiques. Cette étude apporte des éléments de discussion quant à la validation, dans les populations et les peuplements naturels, des données écotoxicologiques obtenues au laboratoire. Elle soulève également la question de la localisation tissulaire de l'imprégnation exprimant l'ancienneté ou le mode de contamination et de son influence sur la réponse des biomarqueurs. Enfin, si la validation des biomarqueurs membranaires se confirme, cette étude, par son approche novatrice, dresse un premier bilan de la menace écotoxicologique qui pèse sur les organismes aquatiques d'une aire protégée, résultant en particulier de l'incorporation de polluants organiques persistants (POP) dans les membranes cellulaires.

INTRODUCTION

Les recherches en écotoxicologie aquatique concernent, en une part sans cesse croissante, le développement du concept de biosurveillance des écosystèmes d'eaux continentales ou côtières. Celui-ci se fonde sur la détection précoce d'une réponse éco-physiologique chez les individus appartenant à des espèces bioindicatrices des biocénoses aquatiques exposées aux polluants. Parmi l'extrême diversité des effets de la contamination des écosystèmes aquatiques par des substances chimiques, l'étude des réactions des organismes de nature biochimique et physiotoxicologique, associée à une approche démoécologique, a permis la mise au point d'outils de surveillance écotoxicologique permanente, tels les biomarqueurs, dont l'usage tend à se répandre depuis le début de la dernière décennie.

La Réserve naturelle nationale de Camargue (RNNC) protège, sur la majorité de son domaine, un remarquable ensemble d'écosystèmes aquatiques, la surface des biotopes terrestres, quoique importante en valeur absolue, demeurant minoritaire. Cet ensemble se caractérise par une grande variété de biotopes dulçaquicoles qui résulte d'un gradient géographique de salinité et d'euryhalinité orienté en première approximation dans la direction cardinale. Les habitats les moins salés se situent dans la partie la plus septentrionale de la Réserve, tandis que les étangs inférieurs situés au sud, dans la zone littorale, présentent un caractère paralytique très accentué. Malgré de considérables et permanents efforts de conservation, entrepris voici plus de 75 ans, un ensemble de problèmes menaçant l'intégrité de la Réserve demeurent plus que jamais préoccupants. Ces derniers sont associés, pour une bonne part, à une modification du régime des eaux, liée aux activités rizicoles. Ils se traduisent à la fois par une tendance à la



dessalure des biotopes aquatiques, qui sont intrinsèquement de type lagunaire, donc de salinité variable mais significative (normalement toujours supérieure à 5 pour mille) et à l'apport permanent de micro- polluants, dû à l'usage intensif de produits chimiques (engrais et pesticides) par les activités agricoles riveraines. En outre, un transfert non négligeable d'aéropolluants *via* les précipitations résulte de la présence au sud-est d'un grand pôle industriel européen (Marseille-Fos) marqué par une forte pollution atmosphérique résultant d'un vaste complexe pétrochimique. Celle-ci est doublée d'une circulation très intense de véhicules à moteur diesel générée par l'acheminement routier du fret maritime (Ramade, 1992, 2000).

Ces diverses considérations nous ont conduits à mettre en œuvre dès 1995 un important programme de recherches écotoxicologiques, comportant en particulier un volet méthodologique relatif à la biosurveillance des biocénoses exposées, et fondé sur l'usage de biomarqueurs. Ce type de recherche est analogue à celles effectuées et/ou en cours dans diverses zones sensibles (Nord-Ouest de la Méditerranée : Burgeot *et al.*, 1996 ; Mer du Nord : Van der Oost *et al.*, 1996, 1997 ; Michel *et al.*, 1998). Ce programme présente plus particulièrement comme objectif la définition de biomarqueurs utilisables *in situ*. La plupart des biomarqueurs actuellement en usage a été définie par des recherches en laboratoire, sous administration de toxique contrôlée, généralement éloignée des conditions réelles d'exposition, et dans un environnement très artificiel, simulé au mieux par des mésocosmes. Ces expérimentations concernant le plus souvent des organismes isolés, élevés *in vitro* dans des conditions écologiques très différentes de celles prévalant dans les écosystèmes. Il est donc certain que la représentativité de ce type d'investigations et l'interprétation des résultats obtenus par leur usage, lorsqu'elles sont transposées à des populations naturelles pour des évaluations écotoxicologiques des zones polluées, peut soulever quelques difficultés voire donner lieu à discussion. Les réflexions précédentes nous ont conduits, afin d'obvier aux lacunes précitées à procéder à des recherches sur des populations naturelles vivant dans un écosystème protégé qui peut être pris comme terme de référence.

Dans les étangs camarguais, les xénobiotiques d'origine agricole ou industrielle sont apportés par les canaux d'irrigation, le lessivage des sols, les pluies et autres précipitations atmosphériques humides ou sèches. Nos travaux antérieurs ont mis en évidence dans les poissons de la RNNC la présence de concentrations notables d'insecticides organochlorés (OC), d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et de polychlorobiphényles (PCB) (Buet *et al.*, 1998, 2001 ; Roche *et al.*, 2000, 2001 et Roche *et al.*, autres publications exposées dans le présent fascicule). L'estimation des risques liés à la présence de ces divers contaminants est envisagée par la recherche des relations entre le niveau d'imprégnation tissulaire des individus et les variations de paramètres biologiques critiques. Il s'agit d'estimer les effets toxicologiques de nature écophysiological, résultant de la présence de ces polluants organiques persistants (POP) sur les peuplements de poissons de l'étang de Vaccarès, notamment les anguilles. Cette évaluation de l'imprégnation tissulaire passe par l'étude des mécanismes de défense (réponses physiologiques ou biochimiques compensatoires) et des processus de (bio)dégradation ou de biotransformation des polluants. En sus de ses applications évidentes à la surveillance écotoxicologique permanente de l'environnement, cette évaluation devrait servir de base à l'estimation *in situ* des effets à long terme d'une pollution fluctuante de faible amplitude et permettre de définir et de valider des biomarqueurs.



Chez les poissons, les effets sublétaux d'un stress environnemental se traduisent par des réponses hiérarchisées selon le type de perturbation, sa chronicité ou son intensité, et le niveau d'organisation biologique de l'espèce concernée. On considère que la réponse primaire est endocrinienne, elle se concrétise par la libération des catécholamines dans le pool sanguin et la production d'hormones corticostéroïdes (Kumschnabel & Lackner, 1993). La réponse secondaire associe les effets métaboliques des catécholamines et du cortisol (hyperglycémie, altération des réserves glycogéniques, lipolyse ou inhibition de la synthèse protéique, etc.) aux perturbations osmotiques et ioniques et aux effets hématologiques (Roche & Bogé, 1996). Les conséquences de la réponse tertiaire sont plus préoccupantes (Jobling, 1995) ; ce sont des effets clandestins et pernicieux dont les conséquences sont de nature démoécologique qui conduisent souvent à terme, au travers d'un ralentissement de la croissance et/ou d'une discrète mais persistante réduction du potentiel biotique, à un déclin des populations.

On utilise l'expression de ces processus pour définir les indicateurs biochimiques des perturbations environnementales, notamment les réponses primaires et secondaires qui présentent généralement un caractère de réversibilité. L'organisme réagit en mettant en place des systèmes de défense (induction enzymatique, stimulation des métabolismes, détoxification, etc.). Pour les anguilles de Camargue, la sélection des biomarqueurs a été établie de manière à cerner plusieurs processus métaboliques. Il y figure des paramètres impliqués dans le métabolisme énergétique comme des teneurs en substrats énergétiques et éléments constitutifs du muscle et du foie : lipides (neutres et polaires), protéines et glycogène. Il s'agit également de l'activité des ATPases musculaires et branchiales, acteurs essentiels de l'énergie cellulaire, qui ont un rôle-clé dans les processus d'osmorégulation. Leur localisation cellulaire en fait, en outre, d'excellents marqueurs membranaires. En complément d'autres activités membranaires, les acétylcholinestérases (AChE) musculaires et cérébrales, cibles privilégiées des organophosphorés et des carbamates, sont mesurées. Lors de leur pénétration dans les organismes, les POP subissent des processus enzymatiques de biotransformation, qui consistent à les rendre plus hydrosolubles. On distingue deux phases dans ces processus : la phase 1 ou phase de fonctionnalisation, essentiellement assurée par des monooxygénases à cytochrome P450 (MFO), qui consiste à introduire dans la molécule exogène un groupe polaire, et la phase 2, ou phase de conjugaison, assurant la liaison d'une substance hydrophile endogène avec ce groupe polaire et en permet ainsi l'élimination. De nombreux programmes de biosurveillance utilisent la mesure de l'EROD en tant que biomarqueur (Cavanagh *et al.*, 2000). Les activités de l'éthoxyrésorufine-*O*-dééthylase (EROD), enzyme de phase 1, et des enzymes de phase 2, l'uridine diphosphate glucosyl transférase (UDPGT) et les glutathion *S*-transférases (GST) sont mesurées dans le foie des anguilles. Enfin, des radicaux libres sont produits lors de nombreux processus métaboliques endogènes ou exogènes. Leur formation est contrôlée par des systèmes enzymatiques antioxydants dans lesquels interviennent les superoxydes dismutases (SOD), et les peroxydases, dont les glutathion peroxydases totales et sélénium-dépendantes et les catalases. Leurs activités hépatiques sont prises en compte dans cette étude. Chez les poissons, de nombreux travaux ont validé la mesure de leur activité, tant au niveau sanguin qu'au niveau hépatique en tant que biomarqueurs aspécifiques (Bogé & Roche, 1996 ; Roche & Bogé, 1996 ; Roche & Bogé, 2000).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

LES POISSONS

72 anguilles (*Anguilla anguilla*) ont été prélevées au cours de campagnes de pêche semestrielles effectuées en 1998 et 1999 dans l'étang de Vaccarès.

MÉTHODES ANALYTIQUES

Les composés organochlorés, lindane (γ -HCH), la dieldrine, le *pp'*-DDE, l'hexachlorobenzène (HCB) et, un groupe de 22 congénères de polychlorobiphényles (PCBs) sont analysés dans les lipides musculaires et hépatiques extraits par la méthode de Folch *et al.* (1957). Ces OC purifiés sur colonne de florisil sont identifiés et quantifiés par chromatographie en phase gazeuse (CPG) équipée d'un détecteur à capture d'électrons (ECD).

Les 16 molécules d'HAP considérées comme polluants majeurs sont dosées dans la vésicule biliaire et les lipides musculaires et hépatiques au moyen d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse quadripolaire HP 5972 (GC/MS) et équipé d'un détecteur à ionisation à impact électronique (EI). Il s'agit des naphthalène, acénaphthylène, acénaphtène, fluorène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène, pyrène, benzo(*a*)anthracène, chrysène, benzo(*b*)fluoranthène, benzo(*k*)fluoranthène, benzo(*a*)pyrène, indéno(1,2,3-*cd*)pyrène, dibenzo(*ah*)anthracène et benzo(*ghi*)pérylène.

MÉTHODES BIOCHIMIQUES

La constitution tissulaire du foie et du muscle est évaluée à l'aide de la méthode de Folch *et al.* (1957) pour les lipides et la technique de Lowry *et al.* (1951) pour les protéines. Les concentrations en phosphore lipidique sont déterminées sur des aliquotes de lipides totaux par la méthode de Fiske & Subbarow (1925). Le glucose libéré après hydrolyse enzymatique du glycogène est mesuré par une méthode adaptée de celle d'Hugget & Nixon (1952). L'activité EROD est évaluée sur la fraction microsomale hépatique d'après la méthode spectrofluorimétrique de Burke & Mayer (1974), alors que la mesure de l'activité GST est basée sur l'apparition du chloro 2,4 dinitrobenzène conjugué avec le glutathion réduit selon la méthode de Habig *et al.* (1974) ; celle de l'UDGPT microsomiale est réalisée d'après Castren & Oikari (1983). La cinétique d'oxydation du NADPH, donneur d'électrons, lors de la réduction du glutathion oxydé en glutathion réduit est utilisée pour la mesure de l'activité des glutathion peroxydases (GPx) (Tappel, 1978). L'activité totale SOD est évaluée par la mesure de l'inhibition de la transformation de l'adrénaline en adrénochrome par l'anion superoxyde libéré par le couple hypoxanthine-xanthine oxydase (méthode adaptée de Misra & Fridovich, 1972 ; Buet, 2002). L'activité de la catalase est estimée par la cinétique de disparition du peroxyde d'hydrogène (Beers & Sizer, 1952). Les activités ATPasiques sont évaluées dans les branchies et les muscles par dosage colorimétrique du phosphore inorganique libéré après hydrolyse de l'ATP en ADP (Schmitz *et al.*, 1973). L'activité ouabaïne résistante est déduite de l'activité totale pour l'évaluation des Na,K-ATPases. La mesure de l'activité AChE est réalisée selon la méthode d'Ellman *et al.* (1961).

ANALYSES STATISTIQUES

L'analyse statistique des données est effectuée avec le logiciel Statview 4.02 (Abacus concepts Inc., California) équipant un micro-ordinateur Macintosh. Les relations entre les paramètres biologiques et les taux d'imprégnation tissulaires par les micropolluants organiques sont mises en évidence par des tests de corrélation de Pearson.

RÉSULTATS

Les corrélations significatives entre les teneurs biliaires en micropolluants et les marqueurs métaboliques sont rares en dépit de l'ampleur de la gamme de paramètres biologiques considérés (Tableau I). Dans le foie, la teneur en glycogène augmente avec l'imprégnation par la plupart des substances organochlorées, à l'exception de la dieldrine. Alors que le glycogène hépatique est significativement corrélé avec le taux de lindane musculaire, celui-ci étant également lié au taux de glycogène musculaire. Dans le muscle, le glycogène et les HAP dont le poids moléculaire est inférieur à 230 g (du naphthalène au chrysène) présentent un grand nombre de corrélations souvent très significatives. Cependant, les corrélations les plus fréquentes concernent le taux de protéines musculaires et les HAP et PCB présents dans les tissus et particulièrement dans le muscle. Deux uniques relations sont mises en évidence entre l'EROD hépatique et les niveaux de contamination, elles intéressent exclusivement le fluoranthène et le dibenzo(*ah*)anthracène détectés dans la bile. D'autre part, la GST semble activée par la présence d'anthracène, d'indéno(*cd*)pérylène et de dibenzo(*ah*)anthracène dans le muscle, bien que ces HAP y soient peu abondants. De plus, la seule relation avec l'UDPGT est négative, elle concerne le fluoranthène dans le foie. Il n'apparaît visiblement pas de concordance entre le niveau des activités enzymatiques de biotransformation et la contamination des anguilles du Vaccarès. En revanche les réponses des activités antioxydantes hépatiques sont nombreuses mais complexes quant à leur intensité et leur sens. En effet, les peroxydases (catalase et GPx) sont, d'une part, inhibées par l'acénaphène et le benzo(*a*)anthracène « biliaires », et le benzo(*a*)pyrène « hépatique », d'autre part, stimulées par la présence de micro-contaminants organiques dans le foie et le muscle. Tel est en particulier le cas des OC hépatiques et de quelques HAP « musculaires » avec la catalase et de manière très accentuée des PCB dans le muscle. Les relations statistiques entre les taux de polluants et l'activité SOD totale sont rares mais, quand elles existent, elles présentent la particularité d'être négatives quand l'accumulation est biliaire ou hépatique, et positives quand elle est musculaire. Ce fait est néanmoins exceptionnel puisqu'il n'est observé que pour le lindane et pour les deux molécules HAP comportant 6 cycles benzéniques.

La recherche de l'incorporation de ces substances lipophiles dans les compartiments lipidiques a fait l'objet d'une publication récente (Roche *et al.*, 2002). Nous avons confirmé qu'une partie de ces polluants était « incluse » dans la bicouche phospholipidique membranaire. Nous avons donc recherché si l'accroissement de l'imprégnation était lié à la nature des constituants lipidiques. En réalité, dans le tissu hépatique comme dans le muscle, les concentrations en xénobiotiques sont rarement corrélées avec les teneurs lipidiques totales ou neutres

TABLEAU I

*Relations entre les taux d'imprégnation tissulaire (HAP et OC) et des paramètres biologiques — paramètres métaboliques constitutifs et enzymes de détoxification hépatiques — chez l'anguille du Vaccarès (n = 25 à 60). Valeur du p de Pearson.
(-) coefficient de corrélation négatif.*

concentrations	Paramètres métaboliques				Activités enzymatiques hépatiques						
	glycogène		protéines		GPx	SeGPx	Catalase	SODs	EROD	UDPGT	GST
	foie	muscle	foie	muscle							
biliaires											
acénaphthylène								0,023 (-)			
acénaphthène		0,0002				0,008 (-)		0,008 (-)			
phénanthrène			0,012								
fluoranthène	0,043								<0,0001		
benzo(a)anthracène		0,0001		0,016			0,039 (-)				
benzo(k)fluoranthène								0,019 (-)			
dibenzo(ah)anthracène									0,0007		
hépatiques											
naphtalène			0,011	0,035				0,033			
acénaphthylène	0,016								0,001 (-)		
phénanthrène				0,046				0,015			
fluoranthène							0,0001	0,037 (-)		0,015 (-)	
benzo(b)fluoranthène				0,003							
benzo(k)fluoranthène				0,011							
benzo(a)pyrène				0,040	0,040 (-)						
indéno(1,2,3)pyrène				0,006							
dibenzo(ah)anthracène				0,002							
benzo(ghi)pérylène											
HCB	< 0,0001			0,006	0,0003	< 0,0001	0,024				
lindane	0,010				0,056						
PCB	0,016			0,019	0,027	0,044					
dieldrine					< 0,0001						
pp'-DDE	0,032										
musculaires											
naphtalène		0,0002	0,041	< 0,0001				0,043			
acénaphthylène		0,0001		0,001							
phénanthrène		< 0,0001		0,0002		0,032					
anthracène		< 0,0001		0,008				0,021		0,011	
fluoranthène		< 0,0001		< 0,0001				0,040			
pyrène		< 0,0001		< 0,0001				0,042			
benzo(a)anthracène		< 0,0001		< 0,0001							
chrysène		< 0,0001		0,001		0,030					
benzo(b)fluoranthène			0,0002	0,002							
benzo(k)fluoranthène			0,005	0,001							
benzo(a)pyrène				0,008							
indéno(1,2,3)pyrène				0,036	< 0,0001			0,032		0,022	
dibenzo(ah)anthracène					< 0,0001					0,004	
benzo(ghi)pérylène		0,048		0,0069				0,019			
HCB						< 0,0001					
lindane	< 0,0001	0,023						< 0,0001			
PCB				< 0,0001	< 0,0001	0,0001	< 0,0001	0,04 (-)			
dieldrine				0,017 (-)		0,030 (-)					

(Tableau II) à l'exception de la dieldrine et dans une moindre mesure du lindane. Quand il s'agit des HAP, les corrélations, généralement très peu significatives ($p > 0,05$), sont le plus souvent négatives, indiquant une évolution de sens opposé. Par contre on relève, dans le muscle, des corrélations significatives entre les teneurs en certaines molécules d'HAP et en dieldrine avec les taux de phospholipides. Il s'agit notamment des molécules de plus faible poids moléculaire, moins sujettes aux processus métaboliques de biotransformation. L'absence de corrélation ne signifie pas pour autant qu'il n'y ait pas de stockage dans les graisses de réserve. Nous avons montré précédemment (Buet *et al.*, 2001 ; Roche *et al.*, 2001) que les substances apolaires (comme les HAP et les PCB), normalement éluées sur colonne de gel de silice avec des solvants peu polaires comme le pentane, l'hexane ou l'éther éthylique, se retrouvaient logiquement dans les phases lipidiques neutres, notamment les HAP les plus lourds, réputés plus facilement métabolisables. Cependant une concentration non négligeable était détectée dans les lipides polaires constitués essentiellement de phospholipides membranaires. Le fait que les xénobiotiques se trouvent partiellement incorporés dans les structures lipidiques membranaires nous a conduits à axer notre recherche de biomarqueurs vers des marqueurs enzymatiques membranaires comme les ATPases (Na^+ , K^+ - et totales) branchiales et musculaires et l'AChE musculaire.

TABLEAU II

Corrélations entre l'imprégnation tissulaire par les HAP et les OC, et les constituants lipidiques des tissus

	Imprégnation hépatique (n = 15)			Imprégnation musculaire (n = 20)		
	lipides totaux	lipides neutres	phospho-lipides	lipides totaux	lipides neutres	phospho-lipides
naphtalène						0,007
acénaphène						0,032
acénaphylène						0,039
fluorène						
phénanthrène						0,068
anthracène				0,069	0,068	
fluoranthène						0,011
pyrène						0,023
benzo(a)anthracène	- 0,048	- 0,065				
chrysène	- 0,060	- 0,057				
benzo(b)fluoranthène	- 0,087	- 0,087				
benzo(k)fluoranthène	- 0,087	- 0,087				
benzo(a)pyrène	- 0,025	- 0,027		- 0,080	- 0,076	
dibenzo(ah)anthracène	- 0,099	- 0,097				
indéno(1,2,3)pyrène						
benzo(ghi)pérylène	- 0,097	- 0,095				
	Imprégnation hépatique (n = 89 à 92)			Imprégnation musculaire (n = 94 à 100)		
HCB						
Σ PCB						
lindane		0,026				
dieldrine	0,050	0,0004	0,093	0,002	0,008	< 0,0001
pp'DDE	< 0,0001	0,030				

Il ressort de cette analyse un grand nombre de corrélations positives entre ces activités enzymatiques et les concentrations en HAP tissulaires, suggérant une activation enzymatique aspécifique. Toutefois la réponse des enzymes membranaires dépend de la localisation tissulaire de l'imprégnation (Tableau III).

TABLEAU III

Corrélations de Pearson significatives entre les activités enzymatiques membranaires et la concentration en micropolluants organiques dans le foie et le muscle de l'anguille. n > 19

	Imprégnation hépatique			Imprégnation musculaire			
	ATPases branchies		ATPases muscle	ATPases branchies	ATPases muscle		AChE muscle
	totales	NaK-	totales NaK-	totales	NaK-	totales	NaK-
naphtalène			< 0,0001	0,003			
acénaphène							
acénaphthylène							
fluorène	0,002			0,008			
phénanthrène			0,002				
anthracène			0,039				
fluoranthène			< 0,0001				
pyrène			< 0,0001	0,004			
benzo(a)anthracène			0,068	0,001			
chrysène	0,049		0,007	0,012	< 0,0001	0,061	0,016
benzo(b)fluoranthène	0,038	< 0,0001		0,023	0,0002	0,064	
benzo(k)fluoranthène	0,038	< 0,0001		0,023	0,0002	0,064	
benzo(a)pyrène		0,013		0,004	< 0,0001	0,022	
dibenzo(ah)anthracène	0,002			0,032	0,000	0,062	
indéno(1,2,3)pyrène			0,044	0,037	0,021	0,0002	
benzo(ghi)pérylène	0,009		0,024	0,031	0,0002	0,061	
HCB				0,000	< 0,0001	< 0,0001	
ΣPCB							
lindane							
dieldrine							
pp'DDE							

L'AChE musculaire apparaît comme étant un meilleur marqueur de la présence des HAP dans le tissu hépatique alors que les ATPases s'avèrent plus significatives d'une imprégnation musculaire. L'activité des ATPases ouabaïne résistantes augmentent avec les concentrations en benzo-fluoranthènes, et, accessoirement, en benzo(a)pyrène et benzo(ghi)pérylène. D'autre part, tous les HAP comportant 4 ou 6 cycles benzéniques (du fluoranthène au chrysène, l'indéno(1,2,3)pyrène et le benzo(ghi)pérylène) ainsi que le naphtalène (2 cycles), le phénanthrène et l'anthracène (3 cycles) présentent une relation statistique positive très significative avec l'activité AChE musculaire. D'un autre côté, l'incorporation musculaire du naphtalène, du fluorène et des molécules d'hydrocarbures les plus lourdes (excepté l'indéno(1,2,3)pyrène) stimule les ATPases branchiales totales. Au niveau



musculaire, un des faits les plus notables concerne les corrélations positives très significatives entre l'activité des ATPases (totales et Na^+ , K^+ -dépendantes) et l'imprégnation par les HAP à 5 et 6 cycles auxquels s'ajoute le chrysène. Singulièrement, les corrélations concernant les OC sont rares, elles touchent exclusivement l'HCB, dont la concentration dans le muscle active les Na^+ , K^+ -ATPases branchiales et les ATPases musculaires.

DISCUSSION

Les divers biotopes aquatiques de la Réserve de Camargue sont exposés à une contamination par des xénobiotiques apportés par voie atmosphérique et par le drainage et le ruissellement des eaux sur les terres agricoles qui la jouxtent. En conséquence, la contamination de ses populations de poissons provient pour partie du milieu aquatique *via* les branchies et la peau (phénomène de bioconcentration), et de la nourriture (phénomène de bioamplification). La capacité des organismes à métaboliser puis à éliminer ces composés influence leur bioaccumulation.

La démarche expérimentale que nous avons mise en oeuvre depuis 1996 dans l'étang de Vaccarès a pour objectif la définition des biomarqueurs *in situ*. Elle associe l'étude des mécanismes de défense (réponses physiologiques ou biochimiques compensatoires) et des processus de biodégradation ou de biotransformation des polluants à l'analyse chimique de l'imprégnation tissulaire chez les anguilles. De fait, ce programme de biosurveillance requiert l'analyse d'un grand nombre de paramètres écophysiologiques impliqués dans divers processus métaboliques (énergétique, oxydatif, mécanisme de biotransformation, conduction neuronale, etc.). L'hypothèse d'une contamination des populations de poissons constituant l'ichtyofaune du Vaccarès par ces polluants a été confirmée par la détection des 16 HAPs « prioritaires » et de substances organochlorés dans leurs tissus (voir Roche *et al.*, présent fascicule). Outre l'impact écotoxicologique afférent à l'exposition à ces xénobiotiques, les anguilles, comme la plupart des organismes aquatiques, sont sensibles aux variations temporelles de facteurs biotiques (maturité, âge, état nutritionnel, reproduction, migration) et abiotiques (température, modification des caractéristiques physico-chimiques de l'eau, etc.) qui agissent au niveau de l'ensemble des processus métaboliques. Ceci implique une diversité de réponses vis-à-vis d'une exposition à des contaminants chimiques. D'autre part les activités enzymatiques hépatiques impliquées dans des processus de détoxification (enzymes de biotransformation et enzymes du stress oxydant) sont également sensibles à la saison, au lieu de prélèvement et d'une manière générale aux facteurs abiotiques (Förlin *et al.*, 1995 ; Roche *et al.*, présent fascicule).

Les recherches écotoxicologiques réalisées dans les écosystèmes lenticques naturels de la RNNC impliquent nécessairement l'absence de « population témoin », car aucun biotope limnique de l'aire protégée considérée n'est exempt d'apport de polluants. Cela limite l'usage de tests comparatifs, aussi l'interprétation des données est ici effectuée à l'aide d'analyses statistiques bivariées. Celles-ci mettent en évidence les éventuelles relations entre les réponses biologiques et l'intensité de la contamination et permettent de définir des marqueurs spécifiques, mais ne préjugent pas de l'amplitude de la contamination globale. Plusieurs corrélations ont été relevées. Leur significativité est apparemment liée au poids moléculaire des molécules, notamment celui des HAP, ou à leurs propriétés



physico-chimiques (Log K_{ow} et densité), largement inventoriées par Gert Jan de Maagd *et al.* (1997). Il est admis, en outre, que les molécules les plus lourdes soient plus facilement et plus rapidement métabolisées.

Le glycogène est un marqueur significatif de l'état des réserves énergétiques ; de nombreuses corrélations positives sont identifiées avec les substances organochlorées et les HAP les plus volatils. En conséquence, l'augmentation de la concentration en glycogène tissulaire pourrait faire figure de biomarqueur significatif d'une contamination par des substances organiques chez cette espèce. Cependant ces observations sont en contradiction avec celles classiquement décrites dont certaines conduisent à utiliser la diminution du glycogène tissulaire en tant que biomarqueur. En réalité de nombreux résultats contradictoires sont argumentés dans la littérature. La plupart de ces travaux souligne qu'une intoxication aiguë induit un abaissement du taux de glycogène (Gimeno *et al.* 1995, Sancho *et al.* 1998, Strmac & Braunbeck 1999, Walter *et al.* 2000). Celui-ci est interprété comme étant la conséquence d'une diminution de la prise alimentaire et d'une réduction de la glucogénèse induite par l'inhibition, souvent dose-dépendante, des enzymes-clé de la néoglucogénèse (Feeley, 1995 ; Viluksela *et al.*, 1999). Braunbeck & Appelbaum (1999) observent une diminution des taux de lipides et de glycogène, associée à des modifications ultrastructurales des hépatocytes et des entérocytes à de très faibles doses d'endosulfan chez la carpe. A l'opposé, Thomas *et al.* (1999) ont montré une absence de réponse métabolique liée au glycogène chez la moule exposée à des HAP. Ces auteurs suggèrent que l'exposition chronique à ce type de polluants peut développer chez les organismes aquatiques un phénomène de tolérance physiologique. De même, Oruc & Uner (1998) estiment que, chez *Cyprinus carpio*, le stress chimique induit une élévation de la glycogénolyse, mais une exposition chronique provoque un enchaînement de mécanismes compensatoires révélés par une augmentation du glycogène tissulaire. Les corrélations positives entre les concentrations en glycogène et les charges en microcontaminants chez l'anguille de Camargue tendent à montrer la coexistence d'une altération pathologique et d'une stimulation du métabolisme hépatique. Ces résultats apportent des éléments de discussion quant à la signification des données écotoxicologiques obtenues au laboratoire dans des conditions contrôlées ou *in situ* en zones polluées ou protégées.

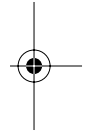
Les concentrations en protéines musculaires augmentent avec les teneurs tissulaires en contaminants, à l'image du glycogène. Un effet métabolique lié au bilan énergétique peut être évoqué ou une action sur la synthèse protéique et plus précisément, enzymatique, due à des processus inductifs. Cependant il semble plus probable, et nos résultats suivants le confirment, que c'est dans leur rôle constitutif que les protéines sont impliquées dans la réponse à la contamination des anguilles du Vaccarès.

L'induction des systèmes de défense enzymatiques contre les xénobiotiques est rarement vérifiée. Ces observations sont en désaccord avec la plupart des études de biosurveillance qui préconisent l'utilisation de l'EROD en tant que biomarqueur en milieu marin depuis une dizaine d'années (Galgani *et al.*, 1992 ; Van der Oost *et al.*, 1996 ; Cavanagh *et al.*, 2000). En revanche, les réponses des activités antioxydantes hépatiques sont nombreuses, mais leur sens est aléatoire. Les enzymes les plus sollicitées sont les GPx et la catalase. Elles sont soit inhibées par des benzo-HAP, soit stimulées par la présence d'OC et de certains HAP « musculaires ». En outre, la catalase est très sensible à l'imprégnation par les PCB, elle répond par une hyperactivité. Au contraire les SOD sont corrélées



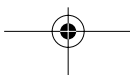
négativement quand la contamination est récente (foie et bile), à l'encontre de la notion d'inductibilité de ces enzymes (Lemaire *et al.*, 1992 ; Livingstone *et al.*, 1993), et activées quand l'accumulation est musculaire. La contradiction de ces réponses peut s'expliquer par le fait que ce ne sont pas seulement des effets au niveau du métabolisme oxydatif qui sont analysés mais également des effets au niveau de la synthèse ou de la maturation des protéines (Roche *et al.*, 2001).

En raison de leur caractère lipophile, on estime classiquement que les taux d'imprégnation et de bioaccumulation des xénobiotiques que nous recherchons dépendent de la constitution des tissus de stockage (Stange & Klungsoyr, 1997). Cependant les corrélations entre les lipides de réserve et les concentrations en contaminants sont rares, en revanche, on relève des corrélations avec les molécules HAP « légères », moins sujettes à la dégradation métabolique, avec les lipides membranaires. Ces observations ont orienté notre recherche vers l'analyse de marqueurs membranaires comme les ATPases branchiales et musculaires et l'AChE musculaire. Les analyses de corrélations entre les charges en HAP et ces activités ont confirmé la pertinence de l'usage de ces systèmes enzymatiques comme biomarqueurs d'exposition aux xénobiotiques concernés. Il est connu que l'interaction des xénobiotiques avec les membranes biologiques altère le métabolisme cellulaire en intervenant, entre autres, sur les enzymes membranaires et les systèmes qui leur sont associés (perméabilité, transport actif, récepteurs, etc.). La localisation cellulaire de l'imprégnation est une approche rarement considérée, cependant elle renseigne sur la chronicité et l'ancienneté de la contamination, ou sur l'amplitude des processus métaboliques de détoxication. La réponse des enzymes membranaires est assurément dépendante de la localisation tissulaire de l'imprégnation. L'AChE musculaire apparaît comme étant un meilleur marqueur de la présence des HAP dans le tissu hépatique et les ATPases sont plus sensibles à une imprégnation musculaire. Les corrélations avec les ATPases branchiales sont fréquentes, souvent très significatives, elles concernent la plupart des molécules HAP indépendamment de leur poids moléculaire à l'exception, et de manière inexplicable, des molécules comportant 3 cycles benzéniques. D'autre part, les concentrations en HAP à haut coefficient de partage octanol-eau ($\text{Log Kow} > 5$), auxquels s'ajoutent le naphthalène (le plus volatil), le phénanthrène (le plus abondant) et l'anthracène sont positivement corrélés avec l'activité AChE musculaire. Curieusement, les corrélations s'adressant aux OC sont rares, elles concernent exclusivement l'HCB. L'absence de relation entre les activités membranaires et le lindane est d'autant plus surprenante que l'incorporation membranaire de cette molécule, en raison de son analogie structurale avec l'inositol, a depuis longtemps été montrée (Srivastava, 1951 ; Antunes-Madeira & Madeira, 1989). Demael *et al.*, dès 1987, avaient décrit les perturbations des activités enzymatiques membranaires induites par l'inclusion du lindane dans la matrice phospholipidique.



CONCLUSION

Chez les organismes aquatiques, les mécanismes de détoxication sont les premiers sollicités par la présence de xénobiotiques. Cependant l'intensité de la contamination par des polluants organiques persistants (OC et HAP) des anguilles du Vaccarès ne stimule pas les systèmes enzymatiques de biotransformation dont



l'utilisation est désormais classique dans les zones polluées. Les ATPases branchiales et musculaires, et l'ACHé musculaire présentent ici une plus grande signification en termes de biomarqueurs. En effet, ces enzymes membranaires répondent à l'incorporation des substances lipophiles dans la matrice phospholipidique, alors que l'hyperactivité EROD hépatique répondrait à un stress chimique plus aigu. Le glycogène est un marqueur sensible, significatif de l'état des réserves énergétiques. L'existence d'une liaison entre ces réserves et des activités enzymatiques de défense de l'organisme accrédirait son utilisation comme biomarqueur. Or, nous avons précédemment mis en évidence une relation entre les taux de glycogène et les activités antioxydantes catalase et SOD (résultats en cours de publication). Ces dernières ainsi que les activités liées au glutathion sont sensibles à la présence de contaminants lipophiles. Aussi, il nous paraît opportun de considérer ces paramètres comme faisant partie des biomarqueurs potentiels chez les anguilles d'une zone protégée. En outre, l'amplitude et le sens de variation de ces paramètres sont dépendants de la nature du compartiment tissulaire de stockage et de son potentiel de dégradation métabolique des xénobiotiques. Néanmoins, le choix d'indicateurs biologiques symptomatiques des effets à long terme s'oriente manifestement vers des marqueurs significatifs de l'intégrité des membranes. Il s'agit des activités ATPasiques, impliquées à la fois dans le métabolisme énergétique et dans les processus d'osmorégulation, et de l'ACHé, liée à la conduction neuronale et également utilisée comme indicateur d'intoxication par des substances organophosphorées et des carbamates.

Par ailleurs, la mise en évidence de réponses significatives de la population d'anguilles du Vaccarès, grâce aux divers biomarqueurs d'exposition et d'effet que nous avons utilisés dans les recherches ci-dessus, montre que l'exposition permanente des peuplements de poissons de la RNNC par les polluants organiques persistants entre déjà dans des domaines où existe une forte présomption d'effets écophysiologicals et physiotoxicologiques défavorables pour les populations ichtyennes exposées à ces contaminants xénobiotiques.

RÉFÉRENCES

- ANTUNES-MADEIRA, M.C. & MADEIRA, V.M. (1989). — Membrane fluidity as affected by the insecticide lindane. *Biochim. Biophys. Acta*, 982 : 161-166.
- BEERS, J.R. & SIZER, L.W. (1952). — A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.*, 195 : 133-140.
- BOGÉ, G. & ROCHE, H. (1996). — Cytotoxicity of phenolic compounds in *Dicentrarchus labrax* erythrocytes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57 : 171-178.
- BRAUNBECK, T & APPELBAUM, S. (1999). — Ultrastructural alterations in the liver and intestine of carp *Cyprinus carpio* induced orally by ultra-low doses of endosulfan. *Dis. Aquat. Org.*, 36 : 183-200.
- BUET, A., ROCHE, H., HABERT, H., CAQUET, T. & RAMADE, F. (1998). — Evaluation du niveau de contamination par les micropolluants organiques des poissons de la Réserve de Biosphère de Camargue. Proposition d'un plan expérimental pour la validation de biomarqueurs utilisables *in situ*. *Ichthyophysiol. Acta*, 21 : 61-76.
- BUET, A., ROCHE, H., ANHEIM, S. & RAMADE, F. (2001). — Méthode d'évaluation du niveau de contamination par des polluants organiques persistants des communautés de la réserve de Biosphère de Camargue. *Ichthyophysiol. Acta*, 23 : 57-70.
- BUET, A. (2002). — *Impact biologique des HAP chez l'Anguille européenne. Définition et validation de biomarqueurs in situ*. Thèse de Doctorat, Université Paris-Sud XI, 194 p.

- BURGEOT, T., BOCQUÉNÉ, G., PORTE, C., DIMEET, J., SANTELLA, R.M., GARCIA DE LA PARRA, L.M., PFHOL-LESZKOWICZ, A., RAOUX, C. & GALGANI, F. (1996). — Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean sea. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 131 : 125-141.
- BURKE, M.D. & MAYER, R.T. (1974). — Ethoxyresorufin : direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Met. Disp.*, 6 : 583-588.
- CASTREN, M. & OIKARI, A. (1983). — Optimal assay conditions for liver UDP-glucuronosyl transferase from the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 76 c : 365-369.
- CAVANAGH, J.E., BURNS, K.A., BRUNSKILL, G.J., RYAN, D.A.J. & AHOKAS, J. T. (2000). — Induction of hepatic cytochrome P-450 1A in pikey bream (*Acanthopagrus berda*) collected from agricultural and urban catchments in far North Queensland. *Mar. Pollut. Bull.*, 41 : 7-12.
- DEMAEL, A., LEPOT, D., COSSARINI-DUNIER, M. & MONOD, G. (1987). — Effect of gamma-hexachlorocyclohexane (lindane) on carp (*Cyprinus carpio*). II. Effects of chronic intoxication on blood, liver enzymes, and muscle plasmic membrane. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 13 : 346-51.
- ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES, V. & FEATHERSTONE, R.M. (1961). — A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7 : 88-95.
- FEELEY, M.M. (1995) — Biomarkers for Great Lakes priority contaminants : halogenated aromatic hydrocarbons. *Environ. Health Perspect.*, 103 : 7-16
- FISKE, C. & SUBBAROW, Y. (1925). — The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 66 : 375-400.
- FOLCH, J., LESS, M. & SLOANE-STANLEY, G.H. (1957). — A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226 : 497-509.
- FÖRLIN, L., LEMAIRE, P. & LIVINGSTONE, D. (1995). — Comparative studies of hepatic xenobiotic metabolizing and antioxidant enzymes in different fish species. *Mar. Environ. Res.*, 39 : 201-204.
- GALGANI, F., BOCQUÉNÉ, G. & CADIOU, Y. (1992). — Evidence of variation in cholinesterase activity in fish along a pollution gradient in the North Sea. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 91 : 77-82.
- GERT-JAN DE MAAGD, P., DORIE, T.E.M., VAN DE HEUVEL, H., OPPERHUIZEN, A. & SIJM, D. (1997). — Physicochemical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons : aqueous solubilities *n*-octanol/water partition coefficients, and Henry's law constants. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17 : 251-257.
- GIMENO, L., FERRANDO, M.D., SANCHEZ, S., GIMENO, L.O. & ANDREU, E. (1995). — Pesticide effects on eel metabolism. *Environ. Saf.*, 31 : 153-157.
- HABIG, W.H., PABST, M.J. & JAKOBY, W.B. (1974). — Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249 : 7130-7139.
- HUGGET, A.S.G. & NIXON, D.A. (1957). — Use of glucose oxidase, peroxidase and O-dianisidine in determination of blood and urinary glucose. *The Lancet*, 2 : 368-379.
- JOBLING, M. (1995). — Human impacts on aquatic environments. Pp. 415-436, in : *Environmental biology of fishes*. Fish and fisheries series 16, Chapman & Hall, London.
- KUMSCHNABEL, G. & LACKNER, R. (1993). — Stress responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* alevins. *Comp. Biochem. Physiol.*, 104A : 777-784.
- LEMAIRE, P., MATHIEU, A., CARRIÈRE, S., NARBONNE, J.F., LAFAURIE, M. & GIUDICELLI, J. (1992). — Bio-transformation enzymes in aquaculture european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) : Kinetic parameters and induction with benzo(a)pyrene. *Comp. Biochem. Physiol.*, 103B : 847-853.
- LIVINGSTONE, D.R., LEMAIRE, P., MATTHEWS, A., PETERS, L., BUCKE, D. & LAW, R. (1993). — Pro-oxidant, antioxidant and 7-Ethoxyresorufin O-Deethylase (EROD) activity responses in liver of Dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals. *Marine Pollut. Bull.*, 26 : 602-606.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951). — Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265-275.
- MICHEL, X., NARBONNE, J.F., MORA, P., DAUBÈZE, M., RIBERA, D., LAFAURIE, M., BUDZINSKI, H. & GARRIGUES, P. (1998). — Indicateurs biochimiques de pollution des écosystèmes côtiers : expérience du groupe Interface Chimie-Biologie des Ecosystèmes Marins (GICBEM). Pp. 9-32, in : L. LAGADIC, T. CAQUET, J.C. AMIARD, F. RAMADE (eds), *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*. Tec. & Doc. Lavoisier, Paris, France.
- MISRA, H.P. & FRIDOVICH, I. (1972). — The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 247 : 6960-6962.
- ORUC, E.O. & UNER, N. (1998) — Effects of azinphosmethyl on some biochemical parameters in blood, muscle, and liver tissues of *Cyprinus carpio* (L.). *Pest. Biochem. Physiol.*, 62 : 65-71.
- RAMADE, F. (1992). — *Précis d'écotoxicologie*. Collection d'Ecologie 22, Masson, Paris, p. 170-171.

- RAMADE, F. (2000). — *Dictionnaire encyclopédique des pollutions*. Ediscience International, Paris, p. 217 et suiv.
- ROCHE, H. & BOGÉ, G. (1996). — Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical intoxication. *Mar. Environ. Res.*, 41 : 27-43.
- ROCHE, H. & BOGÉ, G. (2000). — *In vivo* effects of phenolic compounds on blood parameters of a marine fish (*Dicentrarchus labrax*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 125C : 345-353.
- ROCHE, H., BUET, A., JONOT, O. & RAMADE, F. (2000). — Organochlorine residues in european eel (*Anguilla anguilla*), crusian carp (*Carassius carassius*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*) from Vaccarès lagoon (French National Reserve of Camargue) - Effects on some physiological parameters. *Aquat. Toxicol.*, 48 : 443-459.
- ROCHE, H., BUET, A. & RAMADE, F. (2002). — Accumulation of lipophilic microcontaminants and biochemical responses in eels from the Biosphere Reserve of Camargue. *Ecotoxicology*, 11 : 155-164.
- ROCHE, H., DORVAL, J., BUET, A., FREITAS, S. & RAMADE, F. (2001). — Contamination des anguilles de la Réserve Naturelle de Camargue par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) et recherche de biomarqueurs. *Ichthyophysiol. Acta*, 23 : 71-85.
- SANCHO, E., FERRANDO, M.D. & ANDREU, E. (1997). — Inhibition of gill Na^+, K^+ -ATPase activity in the eel, *Anguilla anguilla*, by fenitrothion. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 38 : 132-136.
- SCHMITZ, J., PREISER, H., MAESTRACCI, D., GHOSH, B.K., CERDA, J.J. & CRANE, R.K. (1973). — Purification of the human intestinal brush border membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, 323 : 98-112.
- SRIVASTAVA, A.S. (1951). — Studies on the modern insecticides, mechanism and physiological action of γ -BHC. *Indian Med. Record*, 71 : 43-50.
- STANGE, K. & KLUNGSOYR, J. (1997). — Organochlorine contaminants in fish and polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from the Barents sea. *ICES J. Mar. Sci.*, 54 : 318-332.
- STRMAC, M. & BRAUNBECK, T. (1999). — Effects of triphenyltin acetate on survival, hatching success, and liver ultrastructure of early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotox. Environ. Saf.*, 44 : 25-39.
- TAPPEL, A.L. (1978). — Glutathione peroxidase and hydroperoxides. *Meth. Enzym.*, 52 : 506-513.
- VAN DER OOST, R., GOKSOYR, A., CELANDER, M., HEIDA, H. & VERMEULEN, N.P.E. (1996). — Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) - II. Biomarkers : pollution-induced biochemical responses. *Aquat. Toxicol.* 36 : 189-222.
- VAN DER OOST, R., VINDIMIAN, E., VAN DEN BRINK, P.J., SATUMALAY, K., HEIDA, H. & VERMEULEN, N.P.E. (1997). — Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). III. Statistical analysis of relationships between contaminant exposure and biomarkers. *Aquat. Toxicol.*, 39 : 45-75.
- VILUKSELA, M., UNKILA, M., POHJANVIRTA, R., TUOMISTO, J.T., STAHL, B.U., ROZMAN, K.K. & TUOMISTO, J. (1999). — Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on liver phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) activity, glucose homeostasis and plasma amino acid concentrations in the most TCDD-susceptible and the most TCDD-resistant rat strains. *Arch. Toxicol.*, 73 : 323-336.
- WALTER, G.L., JONES, P.D. & GIESY, J.P. (2000). — Pathologic alterations in adult rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, exposed to dietary 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Aquat. Toxicol.*, 50 : 287-299.

