



## 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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITE DE METZ**  
UFR Sciences Fondamentales et Appliquées  
Laboratoire Ecotoxicité et Santé Environnementale



## **THESE DE DOCTORAT**

Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources Procédés Produits Environnement  
Discipline : Sciences de la Vie  
Mention : Toxicologie de l'environnement

Présentée par

**Sandrine PAIN**

# **POTENTIEL BIOMARQUEUR DU MECANISME DE DEFENSE MULTIXENOBIOTIQUE (MDMX) CHEZ *DREISSENA* *POLYMORPHA* POUR LE SUIVI DE LA POLLUTION ORGANIQUE EN EAUX DOUCES**



Soutenue le 4 avril 2003 devant le Jury composé de :

**Jean Claude PIHAN**

Professeur à l'Université de Metz

Président

**Laurent LAGADIC**  
**François LEBOULENGER**

Directeur de Recherche INRA de Rennes  
Professeur à l'Université du Havre

Rapporteur  
Rapporteur

**Marc PARANT**  
**Paule VASSEUR**

Maître de Conférences à l'Université de METZ  
Professeur à l'Université de Metz

Examineur  
Examineur

Directeur de thèse : Jean Claude PIHAN  
Responsable scientifique : Marc PARANT

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ



022 486057 0

**UNIVERSITE DE METZ**  
UFR Sciences Fondamentales et Appliquées  
Laboratoire Ecotoxicité et Santé Environnementale

**THESE DE DOCTORAT**

Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources Procédés Produits Environnement

Discipline : Sciences de la Vie

Mention : Toxicologie de l'environnement

Présentée par

**Sandrine PAIN**

**POTENTIEL BIOMARQUEUR DU MECANISME DE DEFENSE  
MULTIXENOBIOTIQUE (MDMX) CHEZ *DREISSENA*  
*POLYMORPHA* POUR LE SUIVI DE LA POLLUTION  
ORGANIQUE EN EAUX DOUCES**



Soutenue le 4 avril 2003 devant le Jury composé de :

**Jean Claude PIHAN**

Professeur à l'Université de Metz

Président

**Laurent LAGADIC**

Directeur de Recherche INRA de Rennes

Rapporteur

**François LEBOULENGER**

Professeur à l'Université du Havre

Rapporteur

**Marc PARANT**

Maître de Conférences à l'Université de METZ

Examineur

**Paule VASSEUR**

Professeur à l'Université de Metz

Examineur

Directeur de thèse : Jean Claude PIHAN

Responsable scientifique : Marc PARANT

## *Remerciements*

*En premier lieu, je tiens tout particulièrement à remercier le Professeur Jean-Claude PIHAN, directeur de cette thèse, pour m'avoir accueilli dans son équipe de recherche depuis plus de quatre ans déjà, et pour m'avoir permis d'y faire évoluer cette recherche.*

*J'adresse mes remerciements les plus sincères à Marc PARANT, qui a accepté la charge de responsable scientifique durant ce travail de recherche. La route fut longue depuis l'ébauche du sujet jusqu'à la réalisation de ce mémoire, mais elle fut surtout enrichissante. Nos longues discussions scientifiques, la pertinence de tes remarques et critiques m'ont été plus qu'utiles dans les moments de doute, quand j'avais pas la bouée...*

*Toute ma reconnaissance va à Laurent LAGADIC et François LEBOULENGER, pour l'honneur qu'il m'ont fait en acceptant de juger la qualité scientifique du présent manuscrit.*

*Je souhaite exprimer ma gratitude à Paule VASSEUR, pour avoir accepté de participer à ce jury, ainsi que pour avoir contribué à cette recherche en mettant à ma disposition le matériel nécessaire à sa réalisation.*

*Mes remerciements vont également à tous les membres des différentes équipes de recherche de l'Université de Metz, qui ont, à des titres divers, participé à la réalisation de ces travaux.*

*Tous mes remerciements à Jean-Nicolas BEISEL et Simon DEVIN, pour leur soutien statistique et leurs conseils avisés dans mes tourmentes non-paramétriques.*

*Voici venu le moment de remercier mes collaborateurs au quotidien et tout particulièrement Laure GIAMBERINI, Antoinette MEYER, Lionel LEGLIZE, Philippe ROUSSELLE, Nathalie KLEINEN et Catherine DRUI, pour leur disponibilité et tous les coups de main, grands et petits...*



*Et à toutes les autres personnes, dont les sourires et petits mots sympathiques ont rendu les longs couloirs tellement plus accueillants...*

*Et mes collègues et amis thésards, et autres étudiants de tout poil dans tout ça ? Ne vous inquiétez pas, vous n'allez pas y couper ! Alors merci Karine, Edwige, Vincent, Guillaume, Samuel, Jean-Marc, Christophe, Virginie, Simon, Marie, Seb, et les autres...*

*Un clin d'œil à Gilles, Gus, Mathieu, Elise, Julien et les sportifs du dimanche.*

*De proches en proches, il est temps de les couvrir de mercis, tous ces proches, dont le soutien a été essentiel pendant ces années.*

*Merci mes parents, mon frère, ma sœur, et Jojo, qui malgré la distance, m'avez soutenue et encouragée dans cette aventure.*

*Merci également à ma famille d'adoption pour leurs encouragements et leur soutien logistique, qui Devin bien utile et réconfortant tout au long de cette rédaction.*

*Merci Simon, pour tout...*

# SOMMAIRE

Liste des Abréviations  
Liste des Figures  
Liste des Tableaux  
Définitions

<b>Introduction Générale .....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 : Analyse Bibliographique .....</b>	<b>4</b>
<b>I – La résistance multidrogue (MDR).....</b>	<b>4</b>
A – La résistance MDR : Historique et Contexte.....	4
1 – Historique.....	4
2 – Contexte : des implications importantes en médecine.....	5
B – Caractéristiques du phénotype MDR.....	6
1 – Expression accrue des transporteurs membranaires .....	6
2 – Phénomènes connexes .....	8
C – La modulation de la résistance MDR.....	10
D – Les P-glycoprotéines (Pgps) chez les mammifères .....	12
1 – Les Pgps, une petite famille multigénique .....	12
2 – Structure et taille des Pgps .....	13
3 – Fonctionnement des Pgps .....	14
4 – Localisation et fonctions physiologiques des Pgps.....	21
<b>II – Le mécanisme de résistance multidrogue (MDR), un système de défense universel dans le règne vivant ? .....</b>	<b>23</b>
A – Les Procaryotes.....	23
B – Les Eucaryotes .....	24
1 – Les Protozoaires.....	24
2 – Les Levures et Champignons .....	24
3 – Les Végétaux.....	25
4 – Les Animaux .....	25
<b>III – Le Mécanisme de Défense MultiXénobiotique (MDMX) chez les Bivalves .....</b>	<b>31</b>
A – Localisation tissulaire.....	31
B – Aspects moléculaires et biochimiques.....	31
1 – Gènes, protéines et mécanisme d'action du MDMX.....	31
2 – Substrats et Inhibiteurs (Modulateurs) du MDMX.....	33
C – Méthodes d'évaluation de l'activité MDMX chez les bivalves.....	36
1 – Méthodes indirectes.....	36
2 – Méthodes directes.....	38
D – Comportement de l'activité MDMX.....	40
1 – Activité constitutive .....	40
2 – Induction du MDMX .....	41
3 – Saturation / inhibition du MDMX .....	43
4 – Variations physiologiques saisonnières .....	44
5 – Comparaison de la réaction du MDMX avec celles de biomarqueurs .....	45
E – Le MDMX : un biomarqueur ?.....	47
1 – Bilan .....	47
2 – Etude de l'activité MDMX chez <i>Dreissena polymorpha</i> .....	49
<b>Chapitre 2 : Matériels et Méthodes .....</b>	<b>50</b>
<b>Chapitre 2.1 : Matériels.....</b>	<b>50</b>
<b>I – Présentation de la Rivière Moselle.....</b>	<b>50</b>
<b>II – Site de prélèvement des dreissènes : La Maxe.....</b>	<b>51</b>
A – Situation géographique et description .....	51

B – Qualité physico-chimique.....	51
C – Répartition de la dreissène <i>Dreissena polymorpha</i> dans la Moselle.....	53
<b>III – Matériel biologique : <i>Dreissena polymorpha</i> .....</b>	<b>55</b>
A – Caractéristiques biologiques et écologiques .....	55
B – La dreissène, une espèce exotique invasive .....	56
C – La dreissène, un organisme sentinelle .....	56
D – Une propriété intéressante dans le cadre de nos travaux : la filtration.....	57
<b>IV – La rhodamine B, un marqueur de l'activité MDMX.....</b>	<b>59</b>
A – Propriétés, métabolisme et toxicité.....	59
B – La rhodamine B, un marqueur de l'activité MDMX .....	61
<b>V – Le vérapamil, un inhibiteur de l'activité MDMX .....</b>	<b>62</b>
A – Propriétés, métabolisme et toxicité.....	62
B – Le vérapamil, un inhibiteur de l'activité MDMX.....	63
<b>Chapitre 2.2 : Méthodes .....</b>	<b>64</b>
<b>I – Méthode d'efflux .....</b>	<b>64</b>
A – Principe de la méthode.....	64
B – Dispositif expérimental .....	65
1 – Généralités.....	65
2 – Acclimatation.....	65
3 – Mesure de l'activité MDMX .....	66
C – Traitement des résultats .....	67
<b>II – Exploitation de la méthode d'efflux .....</b>	<b>68</b>
A – Mesure des niveaux d'activité MDMX chez des dreissènes exposées à différents stress .....	68
1 – Prélèvement des dreissènes.....	68
2 – Dépuration pré-exposition.....	69
3 – Exposition des dreissènes <i>in situ</i> ou en laboratoire.....	69
4 – Dépuration post-exposition .....	70
5 – Suivi de la mortalité et du taux de fixation .....	70
B – Mesure du potentiel inhibiteur des eaux.....	71
1 – Prélèvement des dreissènes et maintien en laboratoire.....	71
2 – Prélèvement d'eaux .....	71
3 – Mesure du potentiel inhibiteur.....	72
4 – Traitement des résultats .....	73
<b>III – Méthode d'accumulation.....</b>	<b>74</b>
A – Principe de la méthode.....	74
B – Dispositif expérimental.....	74
1 – Etape de charge.....	75
2 – Etape de lavage.....	75
3 – Mesure de l'accumulation cellulaire de RB.....	75
<b>IV – Analyses physico-chimiques .....</b>	<b>76</b>
<b>Chapitre 3 : Résultats.....</b>	<b>77</b>
<b>Chapitre 3.1 : Eléments de mise au point de la méthode d'efflux chez <i>Dreissena polymorpha</i> .....</b>	<b>77</b>
<b>I – Evaluation de l'efflux de rhodamine B en fluorimétrie .....</b>	<b>77</b>
A – Principe de la fluorimétrie .....	77
B – Paramétrage du fluorimètre utilisé.....	78
C – Stabilité de la rhodamine B.....	78
1 – Diminution de la fluorescence de la RB au cours du temps .....	79
2 – Influence des stimulations lumineuses exercées par le fluorimètre sur la mesure de fluorescence de la RB .....	79

3 – Conséquences sur le protocole de mesure .....	80
<b>II – Adaptation de la méthode d'efflux .....</b>	<b>80</b>
A – Durée de la phase de charge .....	80
B – Accumulation de RB pendant la phase de charge.....	82
C – Influence de la RB sur l'activité mesurée .....	83
D – Lavages .....	83
E – Inhibition de l'efflux par le vérapamil.....	84
1 – Influence du vérapamil sur la fluorescence de la RB .....	84
2 – Choix de la concentration en vérapamil.....	85

<b>III – Aménagement du protocole .....</b>	<b>86</b>
A – Variabilité interlot .....	86
B – Variabilité intermesure .....	87
C – Limitation des sources de variation .....	88

## **Chapitre 3.2 : Dépuration de l'activité MDMX et activité basale..... 89**

<b>I – Influence de la nourriture sur le processus de dépuration .....</b>	<b>89</b>
A – Objectifs.....	89
B – Suivi de la dépuration .....	89
1 – Activité MDMX .....	89
2 – Taux de fixation des dreissènes au substrat.....	90
C – Bilan.....	91

<b>II – Influence de la température sur le processus de dépuration.....</b>	<b>92</b>
A – Objectifs.....	92
B – Suivi de la dépuration .....	92
1 – Activité MDMX .....	92
2 – Mortalité et Fixation.....	94
C – Bilan.....	94

<b>III – Activité MDMX basale.....</b>	<b>96</b>
A – Activité initiale .....	96
B – Activité dépurée .....	97
C – Facteur de dépuration .....	98
D – Bilan.....	99

## **Chapitre 3.3 : Comportement de l'activité MDMX chez *Dreissena polymorpha* exposée à différents stress et Potentiel Inhibiteur ..... 100**

<b>I – Cas « théoriques » : réaction de l'activité MDMX en laboratoire.....</b>	<b>101</b>
A – La Rhodamine B, un marqueur de l'activité MDMX.....	101
1 – Objectifs.....	101
2 – Dépuration pré-exposition.....	101
3 – Exposition à la rhodamine B .....	102
4 – Dépuration post-exposition chez les dreissènes exposées à RB 50µM.....	103
5 – Bilan .....	104
B – Pollution de type « hydrocarbures » .....	105
1 – Objectifs.....	105
2 – Expérimentation A.....	105
3 – Expérimentation B.....	107
4 – Bilan des expérimentations A et B .....	108

<b>II – Cas « pratiques » : réaction de l'activité MDMX dans les milieux aquatiques naturels .....</b>	<b>110</b>
A – La Fensch (Site sidérurgique, Moselle, 57) .....	110
1 – Objectifs.....	110
2 – Présentation du cours d'eau et des sites d'étude .....	110
3 – Dépuration pré-exposition.....	111
4 – Exposition <i>in situ</i> le long de la Fensch.....	112
5 – Bilan .....	113

B – La Meuse (Centrale nucléaire de production d'électricité, Ardennes, 08) .....	116
1 – Contexte de l'étude .....	116
2 – Présentation du cours d'eau et des sites d'étude .....	116
3 – Analyses physico-chimiques .....	117
4 – Suivi de l'activité MDMX .....	118
5 – Bilan .....	119
C – Pollution liée à l'industrie papetière .....	121
1 – Induction et Potentiel Inhibiteur de l'activité MDMX à Hamoncourt (Belgique) .....	122
2 – Potentiel Inhibiteur de la Moselle à Golbey (Vosges, 88) .....	134
D – La Thur (Usine pétrochimique à Thann, Haut-Rhin, 68) .....	138
1 – Présentation du cours d'eau .....	138
2 – Activité MDMX et potentiel inhibiteur de la Thur .....	139

## **Chapitre 3.4 : Suivi saisonnier de l'activité MDMX chez *Dreissena polymorpha* transférée en Moselle .....**

I – Présentation des sites d'étude .....	142
II – Déroulement du suivi .....	143
A – Dépuration pré-exposition .....	143
B – Exposition <i>in situ</i> et suivi de l'activité MDMX .....	144
C – Suivi de l'activité basale .....	144
D – Traitement statistique .....	144
III – Résultats obtenus lors du suivi de l'activité MDMX chez des dreissènes transférées pendant 15 mois sur trois sites en Moselle .....	146
A – Dépuration pré-exposition .....	146
B – Suivi de l'activité MDMX .....	146
1 – Observations globales .....	146
2 – Activité Basale et La Maxe .....	147
3 – Réponse obtenue sur les sites étudiés sur la Moselle Amont comparée à la réponse obtenue à La Maxe .....	149
C – Structure temporelle et relation entre activité MDMX et physico-chimie .....	150
1 – Analyse globale : Analyse en Composante Principale (ACP) .....	150
2 – Corrélation avec la température .....	152
3 – Régression linéaire multiple .....	152
IV – Bilan du suivi saisonnier .....	153
A – Transfert <i>in situ</i> .....	153
B – Comportement de l'activité basale .....	154
C – Comportement de l'activité MDMX <i>in situ</i> .....	155
1 – La Maxe, Pierre La Treiche et Liverdun .....	155
2 – Existe-t-il un cycle saisonnier de l'activité MDMX chez <i>Dreissena polymorpha</i> ? .....	156

## **Chapitre 4 : Discussion Générale .....**

I – Activité basale .....	158
II – Activité MDMX : quelle réaction et comment interpréter cette réaction ? .....	159
A – Capacités de réaction .....	159
1 – Induction de l'activité MDMX .....	159
2 – Réversibilité de l'induction de l'activité MDMX .....	163
B – Relation entre exposition et réponse .....	163
C – Saturation de l'activité MDMX et mesure du potentiel inhibiteur .....	165
D – Variations saisonnières .....	166
III – Hypothèses pour l'interprétation de la réponse du système MDMX <i>in situ</i> .....	167

<b>Chapitre 5 : Conclusions et Perspectives .....</b>	<b>170</b>
<b>Chapitre 5.1 : Conclusions.....</b>	<b>170</b>
<b>Chapitre 5.2 : Perspectives.....</b>	<b>173</b>
<b>I - Etudes à long terme sur des dreissènes autochtones .....</b>	<b>173</b>
A – Caractériser le site de référence et la population de dreissènes étudiée .....	173
B – Caractériser un site pollué et sa population de dreissènes autochtones.....	173
<b>II - Etudes à court terme sur des dreissènes encagées .....</b>	<b>174</b>
<b>III – Mise en évidence de Pggs-like .....</b>	<b>175</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>176</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>195</b>

## Liste des Abréviations

ABC :	ATP Binding Cassette
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
AERM :	Agence de l'eau Rhin-Meuse
ALD :	Adenoleucodystrophy Protein
AOX :	Composés Organohalogénés Adsorbables
ARNm :	Acide Ribonucléique messagers
ATP :	Adénosine Tri-Phosphate
BCRP :	Breast Cancer Resistance Protein
BERM :	Banque de l'eau Rhin-Meuse
CFTR :	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
cMOAT :	Canalicular Multispecific Organic Anion Transporter
DIREN :	Direction Régionale de L'Environnement
DTs :	Domaines Transmembranaires
GST :	Glutathion-S-Transférases
HSP :	Heat Shock Protein
IARC :	International Agency for the Research on Cancer
LRP :	Lung Resistance Protein
MDMX :	Mécanisme de Défense MultiXénobiotique
MDR :	MultiDrug Resistance
MFS :	Major Facilitator Superfamily
MRP :	Multidrug Resistance associated Protein
MXR :	MultiXenobiotic Resistance
MXR :	MitoXantrone Resistance
NOEC :	No Observed Effect Concentration
OECC :	Observed Effect Concentration
Pgp :	P-glycoprotéine
Pi :	Phosphate inorganique
PI :	Potentiel Inhibiteur
PKC :	Protéine Kinase C
R123 :	Rhodamine 123
R6G :	Rhodamine 6G

**RB :** Rhodamine B

**RND :** Resistance-Nodulation-Division

**SEQ-Eau :** Système d’Evaluation de la Qualité des Eaux

**SMR :** Small Multidrug Resistance

**spgp :** Pgp sœur

**SUR :** Sulfonyleurea Receptor

**VIH-1 :** Virus de l’immunodéficience humaine



# Liste des Figures

## Chapitre 1 : Analyse Bibliographique

- Figure 1.** Structure de deux transporteurs ABC (A, Pgp ; B, MRP).
- Figure 2.** Illustration des principaux modèles proposés pour expliquer le transport des substrats par les Pgps.

## Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

### Chapitre 2.1

- Figure 3.** Carte du cours français de la Moselle de sa source au Col de Bussang jusqu'aux frontières luxembourgeoise et allemande.
- Figure 4.** Localisation géographique et photographies du site de La Maxe, au niveau de la jonction entre la Moselle et le canal d'amenée de la centrale thermique EDF.
- Figure 5.** *Dreissena polymorpha*.
- Figure 6.** Formule développée de la rhodamine B.
- Figure 7.** Formule développée du vérapamil.

### Chapitre 2.2

- Figure 8.** Schéma du principe de la méthode d'efflux.
- Figure 9.** Panier en grillage (10x3cm).
- Figure 10.** Dispositif expérimental.
- Figure 11.** Traitement des données acquises en fluorimétrie par la méthode d'efflux.
- Figure 12.** Déroulement des expérimentations visant à exposer les dreissènes à différents stress.
- Figure 13.** Dispositifs utilisés pour l'exposition des dreissènes.
- Figure 14.** Déroulement de la mesure du potentiel inhibiteur.

## Chapitre 3 : Résultats

### Chapitre 3.1

- Figure 15.** Principe de la fluorimétrie.
- Figure 16.** Evolution au cours du temps (minutes) de la fluorescence (unités de fluorescence) de quatre solutions de RB (0,5 ; 1 ; 1,5 et 1,8 $\mu$ M).
- Figure 17.** Protocole d'étude de l'influence des stimulations répétées sur la mesure de fluorescence de quatre solutions de RB (0,5 ; 1 ; 1,5 et 1,8 $\mu$ M).
- Figure 18.** Influence des stimulations répétées sur la fluorescence de quatre solutions de RB (0,5 ; 1 ; 1,5 et 1,8 $\mu$ M).
- Figure 19.** Influence de la durée de la période de charge sur la mesure de l'activité MDMX.

- Figure 20.** Activité MDMX et accumulation cellulaire de RB pendant la phase de charge.
- Figure 21.** Evaluation de l'efficacité de l'étape de lavage.
- Figure 22.** Effet inhibiteur du vérapamil.
- Figure 23.** Vitesse d'efflux de la RB en présence d'eau déchlorée, de vérapamil (30 $\mu$ M) et d'une eau naturelle.
- Figure 24.** Vitesse d'efflux de la RB en présence d'eau déchlorée.
- Figure 25.** Vitesse d'efflux de la RB en présence d'eau déchlorée, de vérapamil (30 $\mu$ M) et d'une eau naturelle.

### Chapitre 3.2

- Figure 26.** Déroulement de l'expérimentation visant à déterminer l'influence de l'apport en nourriture sur le profil de dépuración en laboratoire de l'activité MDMX.
- Figure 27.** Influence de l'apport de nourriture sur la dépuración de l'activité MDMX.
- Figure 28.** Evolution de l'activité MDMX en fonction de la température du milieu.
- Figure 29.** Evolution du taux de mortalité et du taux de fixation chez les dreissènes exposées aux températures 4, 17, 22 et 29°C.
- Figure 30.** Evolution de l'activité MDMX initiale mesurée chez des dreissènes prélevées à La Maxe et de l'activité dépurée mesurée chez ces mêmes dreissènes après 8 jours en eau déchlorée en laboratoire de novembre 2000 à Octobre 2002.
- Figure 31.** Facteur de dépuración de l'activité MDMX, défini comme le rapport de l'activité initiale sur l'activité dépurée.

### Chapitre 3.3

- Figure 32.** Evolution de l'activité MDMX chez des dreissènes prélevées à La Maxe, dépurées en laboratoire pendant 8 jours, puis exposées à deux concentrations de rhodamine B, RB 5 $\mu$ M et RB 50 $\mu$ M.
- Figure 33.** Réponse des dreissènes exposées à RB 50 $\mu$ M.
- Figure 34.** Comportement de l'activité MDMX chez des dreissènes exposées à un mélange d'hydrocarbures, le fuel oil n°2 (expérimentation A).
- Figure 35.** Comportement de l'activité MDMX chez des dreissènes exposées à un mélange d'hydrocarbures, le fuel oil n°2 (expérimentation B).
- Figure 36.** Localisation des sites d'études le long de la Fensch (vallée sidérurgique en Moselle).
- Figure 37.** Etude de la Fensch.
- Figure 38.** Localisation des sites d'étude de la Meuse aux abords de la centrale électronucléaire de Chooz (Ardennes).
- Figure 39.** Evolution de l'activité MDMX chez des dreissènes dépurées pendant trois jours puis exposées dans la Meuse sur les sites Amont, Aval 1 et Aval 2 pendant 14 et 28 jours au cours de deux campagnes menées en juillet et octobre 1999.
- Figure 40.** Localisation géographique des sites étudiés sur le cours du Ton (Frontière franco-belge).

- Figure 41.** Evolution de l'activité MDMX chez des dreissènes dépurées pendant 6 jours en laboratoire, puis exposées à l'eau prélevée dans le Ton sur le site Aval 1 (AOX = 685µgCl/L) pendant 6 et 12 jours.
- Figure 42.** Induction *in situ* – Expérimentation A (mai 1999).
- Figure 43.** Induction *in situ* – Expérimentation B (mai 2000).
- Figure 44.** Potentiel inhibiteur des eaux prélevées sur le cours du Ton en amont et en aval de la papeterie de Harnoncourt.
- Figure 45.** Localisation des sites d'étude du potentiel inhibiteur de la Moselle à Golbey (Vosges).
- Figure 46.** Potentiel inhibiteur des eaux prélevées dans la Moselle en amont et en aval du rejet d'une papeterie (Amont, Rejet, Aval) à trois périodes de l'année 2000 (avril, mai et novembre).
- Figure 47.** Localisation du site de prélèvement (Thur, Haut Rhin) de l'eau utilisée au cours de l'exposition en laboratoire et pour la mesure du potentiel inhibiteur.
- Figure 48.** Evolution de l'activité MDMX chez des dreissènes dépurées pendant 5 jours et exposées pendant 3 jours à l'eau prélevée dans la Thur.
- Figure 49.** Comparaison des potentiels inhibiteurs de l'eau prélevée dans la Thur et du vérapamil (30µM), évalués chez des dreissènes dépurées.

### Chapitre 3.4

- Figure 50.** Déroulement des différentes étapes du suivi de l'activité MDMX chez des dreissènes encagées sur trois sites étudiés en Moselle : La Maxe, Pierre La Treiche et Liverdun.
- Figure 51.** Déroulement chronologique des mesures de l'activité MDMX.
- Figure 52.** Comparaison du niveau d'activité dépurée obtenue après maintien des dreissènes huit jours en eau déchlorée et des niveaux mesurés un mois après le transfert (août 2001) *in situ* sur les sites de La Maxe, Pierre La Treiche et Liverdun.
- Figure 53.** Suivi de l'activité MDMX chez des dreissènes dépurées en laboratoire (Activité basale) et chez des dreissènes transférées sur trois sites naturels en Moselle (La Maxe, Pierre La Treiche et Liverdun) pendant 15 mois (août 2001 à octobre 2002).
- Figure 54.** Distribution des moyennes mensuelles de l'activité MDMX pour les quatre situations étudiées (Activité basale, n=14 ; La Maxe, n=15 ; Pierre La Treiche, n=14 ; Liverdun, n=14) sur la période s'étendant de août 2001 à octobre 2002.
- Figure 55.** Evolution de l'activité MDMX de août 2001 à octobre 2002 chez des dreissènes prélevées à La Maxe puis dépurées huit jours en laboratoire (Activité Basale) et chez des dreissènes encagées à La Maxe.
- Figure 56.** Evolution de l'activité MDMX de août 2001 à octobre 2002 chez des dreissènes encagées à La Maxe, Pierre La Treiche et Liverdun.
- Figure 57.** Résultats de l'Analyse en Composantes Principales (ACP) normées intra-sites.
- Figure 58.** Corrélation de Pearson calculées pour vérifier le degré de liaison entre l'activité MDMX en pmol.RB/min/org (exprimée en logarithme décimal) et la température de l'eau pour les trois sites naturels (La Maxe, Pierre La Treiche, Liverdun) et pour l'activité basale.

### Chapitre 4 : Discussion

- Figure 59** Schéma théorique des réactions de l'activité MDMX (exprimée en unités arbitraires) mesurée chez des organismes transférés *in situ*.

# Liste des Tableaux

## Chapitre 1 : Analyse Bibliographique

- Tableau I.** Exemples de composés substrats des Pgps.
- Tableau II.** Exemples de composés modulateurs de l'activité des Pgps.
- Tableau III.** Nomenclature couramment utilisée afin de désigner les gènes codant pour les Pgps chez les mammifères.
- Tableau IV.** Le MDMX chez les bivalves.
- Tableau V.** Composés naturels ou anthropiques interagissant avec le MDMX.
- Tableau VI.** Induction du MDMX chez différentes espèces de bivalves après exposition à des composés substrats en laboratoire ou à une contamination naturelle *in situ*.

## Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

- Tableau VII.** Principales propriétés de la rhodamine B.
- Tableau VIII.** Toxicité de la rhodamine B.
- Tableau IX.** Principales propriétés du vérapamil.

## Chapitre 3 : Résultats

### Chapitre 3.2

- Tableau X.** Comparaison des résultats obtenus après 5 (J5) et 10 (J10) jours d'exposition aux quatre températures testées (4, 17, 22 et 29°C).
- Tableau XI.** Résultats des tests statistiques effectués afin de comparer les niveaux d'activité initiale et dépurée au cours d'expérimentations réalisées le même mois au sein d'une même année ou sur deux années consécutives.

### Chapitre 3.4

- Tableau XII.** Matrice de corrélation construite à partir des moyennes mensuelles de l'activité basale et de l'activité mesurée chez les dreissènes implantées à La Maxe, Pierre la Treiche et Liverdun.
- Tableau XIII.** Principales caractéristiques physico-chimiques de la Moselle au niveau des sites étudiés.
- Tableau XIV.** Résultats de la régression multiple mettant en évidence la contribution relative de la température à la variation de la réponse de l'activité MDMX *in situ*.
- Tableau XV.** Récapitulatif des limites de l'intervalle de confiance (90%) de la moyenne de l'activité basale et de l'activité MDMX évaluée chez les dreissènes implantées à La Maxe, Pierre La Treiche et Liverdun au cours du suivi.

## Chapitre 4 : Discussion

- Tableau XVI.** Synthèse des facteurs d'induction obtenus lors des expérimentations *in situ*.
- Tableau XVII.** Synthèse des facteurs d'induction obtenus lors des expérimentations en laboratoire.

## Définitions

Pour plus de clarté et afin d'éviter toute ambiguïté, les termes ci dessous seront définis comme suit :

- La **charge organique substrat** d'une eau sera définie comme la totalité des molécules organiques substrats du MDMX présentes dans cette eau.
- La **charge organique polluante** d'une eau correspondra à la quantité de composés organiques polluants présents dans l'eau, qu'ils soient, ou non, substrats du MDMX.
- La charge **organique environnementale** regroupera l'ensemble des composés organiques présents dans l'eau, qu'ils soient d'origine naturelle ou anthropique, qu'ils soient polluants ou non et qu'ils soient substrats du MDMX ou non.

## Introduction Générale

Les êtres vivants évoluent à l'heure actuelle dans des milieux endommagés par différents types de pollution. La pollution chimique par les xénobiotiques (composés exogènes) constitue une grande part des agressions constamment subies par les organismes. Les milieux aquatiques drainent et recueillent la majorité de cette contamination chimique. Cependant, bien qu'il existe une altération de la biodiversité dans certains de ces milieux, on constate que les organismes qui subsistent se sont adaptés à ces stress constants. Certaines espèces sont même capables de survivre et de se reproduire dans des milieux considérablement dégradés. L'adaptation des êtres vivants à ces milieux se traduit entre autres par la mise en place et le développement de systèmes de défense. Les premières barrières sont mises en place au niveau de l'organisme entier et constituent des protections physiques contre la pénétration des xénobiotiques (coquille, peau, etc.). Si toutefois ces protections s'avèrent inefficaces ou insuffisantes, d'autres systèmes prennent le relais pour protéger les organes et les cellules. En première ligne au niveau cellulaire, un mécanisme protège la cellule de l'action toxique des xénobiotiques en limitant leur accès et en favorisant leur élimination. Chez l'homme, ce système est connu sous le nom de Résistance Multidroge ou MDR (Multidrug Resistance) faisant référence à son implication dans les phénomènes de résistance des cellules tumorales aux agents anticancéreux. Un mécanisme similaire a été identifié chez de nombreux organismes à tous les niveaux d'organisation du règne vivant. Son rôle a été assimilé à une fonction de défense contre les toxines animales et végétales ; ce rôle aurait évolué pour protéger les organismes contre les composés anthropiques présents dans leur milieu. Par analogie avec le phénotype MDR, le mécanisme identifié dans les populations naturelles est couramment appelé MXR pour « MultiXenobiotic Resistance » ou résistance multixénobiotique. On peut souligner que bien qu'elle ait été adoptée par nombre d'auteurs, la terminologie MXR et plus précisément le terme « résistance » ne sont peut-être pas les plus adéquats. En effet, la résistance peut être définie comme une adaptation héréditaire conduisant à la diminution de la sensibilité (Lagadic *et al.*, 1997a). Si les connaissances acquises chez les mammifères permettent d'utiliser cette notion dans le cas des cellules cancéreuses, trop peu de données sont disponibles chez les organismes aquatiques pour avancer l'existence d'une résistance au sens strict. Par conséquent, nous préférons par précaution utiliser le terme « défense »

et nous désignerons ce mécanisme par MDMX pour Mécanisme de Défense MultiXénobiotique (Kurelec, 1995a ; Parant et Pain, 2001).

Chez les organismes aquatiques, l'étude du MDMX s'inscrit dans une approche écotoxicologique visant à utiliser la réaction de cette défense multixénobiotique en tant que témoin de l'exposition des organismes à la pollution organique des écosystèmes aquatiques. Ainsi les potentialités du système MDMX à constituer un biomarqueur pertinent ont été démontrées à l'occasion de travaux réalisés essentiellement chez les bivalves et les poissons à la fois en milieu marin et en milieu dulçaquicole (Kurelec, 1992 ; Burgeot *et al.*, 1999 ; Minier *et al.*, 1999 ; Bard, 2000 ; Livingstone *et al.*, 2000 ; van der Ost *et al.*, 2003).

Depuis une vingtaine d'année, notre laboratoire utilise un bivalve d'eau douce (la dreissène ou moule zébrée, *Dreissena polymorpha*) présent dans la Moselle en tant qu'organisme indicateur de pollution organique et métallique par le biais d'études de bioaccumulation, d'études histologiques et physiologiques (Léglize et Crochard, 1987 ; Mersch *et al.*, 1996 ; Giamberini et Pihan, 1997 ; Ledy, 2002).

Afin de compléter ces approches, nous avons entrepris l'étude du MDMX dont la présence chez la dreissène a été mise en évidence à plusieurs reprises (Smital et Kurelec, 1997 ; Burgeot *et al.*, 1999 ; Jaouen *et al.*, 2000). L'objectif du travail de thèse a été orienté vers la mise en évidence du potentiel du MDMX à constituer un biomarqueur pertinent de contamination organique chez cet organisme.

Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à mettre au point un protocole de mesure de l'activité MDMX exploitable chez la dreissène. Parmi les différents protocoles proposés dans la littérature, notre choix s'est porté vers la méthode d'efflux décrite chez des bivalves par Smital et Kurelec (1997). Il s'agit d'une méthode de mesure directe qui permet d'évaluer l'activité MDMX chez des organismes vivants grâce au suivi de composés traceurs, qui, incorporés de manière passive par les organismes, seront activement rejetés vers le milieu extérieur par la voie MDMX. Cette méthode présente en outre l'avantage d'être rapide et simple à mettre en œuvre.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à montrer l'applicabilité de ce protocole sur le terrain. Ainsi, la première approche a consisté à vérifier qu'il était possible

d'observer une réaction de l'activité MDMX dans les conditions d'une exposition *in situ* sur des sites naturels contaminés. Dans la mesure où l'inductibilité de l'activité MDMX chez la dreissène a été vérifiée, notre travail s'est orienté vers la compréhension des paramètres régissant cette activité et les modalités de sa réaction lorsque les organismes sont exposés à différents stress. La principale démarche adoptée au cours de ce travail a consisté à encager des dreissènes dans différents cours d'eau de la région Grand Est, choisis de manière à permettre l'étude de la réaction du système MDMX en présence de différents types et niveaux de pollution. Ces travaux ont été complétés par des expérimentations en laboratoire. En parallèle, nous avons également appliqué la mesure du potentiel inhibiteur qui consiste à évaluer biologiquement les niveaux de composés substrats du MDMX dans les eaux naturelles.

L'ensemble de ce travail sera présenté selon le plan décrit ci-dessous.

➤ Dans un premier temps, l'analyse bibliographique résumera l'état des connaissances concernant la résistance MDR chez les mammifères. Cette présentation, bien qu'un peu éloignée du sujet direct de la thèse, nous est apparue essentielle au regard des nombreuses comparaisons couramment faites avec les invertébrés. Nous décrirons alors la distribution du mécanisme MDMX dans le règne vivant avant de présenter plus précisément ce système et son implication en écotoxicologie chez les bivalves.

➤ Le chapitre Matériels et Méthodes présentera dans un premier temps les matériels utilisés (matériel biologique et produits chimiques) et le principal site d'étude, puis la méthodologie mise en place en vue de répondre aux objectifs fixés.

➤ L'ensemble des résultats obtenus sera articulé en quatre parties concernant les éléments de mise au point de la méthode d'efflux, la dépuration de l'activité MDMX et la mise en évidence de son niveau basal, l'étude de la réaction de l'activité suite à l'exposition à différents stress en laboratoire et *in situ* ainsi que l'étude du potentiel inhibiteur et enfin, la réalisation d'un suivi saisonnier de l'activité chez des dreissènes transférées en Moselle.

➤ Les principaux résultats seront ensuite synthétisés et discutés dans l'optique de dégager les modalités de la réponse du système MDMX évaluée chez *Dreissena polymorpha*.

➤ Enfin, le dernier chapitre sera consacré aux conclusions et aux perspectives ouvertes par ce travail.



# CHAPITRE 1 : ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

DE LA DECOUVERTE DE LA RESISTANCE MULTIDROGUE (MDR) CHEZ L'HOMME A  
L'UTILISATION DU MECANISME DE DEFENSE MULTIXENOBIOTIQUE (MDMX)  
COMME BIOMARQUEUR POTENTIEL CHEZ LES BIVALVES

## I – La résistance multidrogue (MDR)

### A – La résistance MDR : Historique et Contexte

#### 1 – Historique

La découverte du phénomène de résistance multidrogue (MDR ; MultiDrug Resistance) a été associée à la mise en évidence d'un phénotype de résistance croisée vis à vis d'une large variété de composés cytotoxiques dans des lignées cellulaires cancéreuses exposées à un seul de ces agents (Kessel *et al.*, 1968 ; Biedler et Riehm, 1970). Quelques années plus tard, les travaux de Dano (1973) ont montré que les cellules résistantes étaient dotées d'un système d'efflux leur permettant de rejeter activement les agents cytotoxiques vers le milieu extérieur. En réduisant leur accumulation cellulaire, ce système empêche les agents anticancéreux d'atteindre leurs cibles et d'exercer leur action cytotoxique. Il participe ainsi au développement de la résistance MDR. En 1976, Juliano et Ling ont attribué l'apparition de ce phénotype à la présence d'une glycoprotéine de 170 kDa exprimée uniquement dans les membranes des cellules résistantes. Cette glycoprotéine a été nommée « glycoprotéine P » ou « P-glycoprotéine », la lettre P faisant référence à son implication dans l'altération de la perméabilité membranaire (Juliano et Ling, 1976). Leurs observations ont finalement abouti à l'hypothèse que ces glycoprotéines puissent contrôler et favoriser le passage des composés cytotoxiques au travers de la membrane plasmique, précisant ainsi les travaux de Dano (1973). Ces résultats ont par la suite été confirmés et la P-glycoprotéine a été purifiée en 1979 par Riordan et Ling. Ueda *et al.* (1986) ont mis en évidence le gène *mdr1* codant pour la P-glycoprotéine dans des cellules de carcinome humain. Ces auteurs ont également observé que l'expression des Pgps semblait nécessaire et suffisante pour l'apparition et le développement du phénotype MDR. Parallèlement, d'autres travaux ont précisé le fonctionnement des Pgps en montrant qu'elles étaient capables de lier les substrats pour ensuite les rejeter hors de la cellule (Inaba *et al.*, 1979 ; Cornwell *et al.*, 1986).

Bien que les Pgps aient été les premières structures identifiées comme responsables de l'acquisition et du développement de la résistance de type MDR, la recherche très prolifique à ce sujet a rapidement montré qu'elles n'en étaient pas les acteurs uniques, mais qu'elles étaient intégrées dans un ensemble de mécanismes intervenant plus ou moins directement dans l'apparition de ce phénotype. Ainsi, il a été mis en évidence que la

**Tableau I : Exemples de composés substrats des Pgps (Données compilées d'après Ichikawa et al., 1991 ; Ueda et al., 1992 ; Gottesman et Pastan, 1993 ; Homolya et al., 1993 ; Bain et al., 1997 ; Eytan et al., 1997 ; Germann et Chambers, 1998 ; Seelig, 1998 ; Ambudkar et al., 1999).**

<b>Agents anticancéreux</b>	
Alcaloïdes de la pervenche	Vincristine
	Vinblastine
Anthracyclines	Doxorubicine
	Daunorubicine
	Epirubicine
	Idarubicine
	Mitoxantrone
Epidodophyllotoxines	Etoposide (VP-16)
	Teniposide (VM-24)
Taxanes	Paclitaxel (Taxol)
	Taxotère
Autres Agents anticancéreux	Topotecan
	Mithramycine
	Mitomycine C
<b>Antibiotiques</b>	Actinomycine D
<b>Agents antimicrotubule</b>	Colchicine
<b>Inhibiteurs de la synthèse protéique</b>	Emetine
	Puromycine
<b>Agents intercalants de l'ADN</b>	Bromure d'éthidium
<b>Peptides toxiques</b>	Gramicidine D
	Valinomycine
	N-acétyl-leucyl-leucyl-norleucine
<b>Inhibiteurs de protéases (anti-VIH-1)</b>	Ritonavir
	Indinavir
	Saquinavir
<b>Colorants</b>	Hoechst 33342
	Rhodamine 123
	Rhodamine B
	Rhodamine 6G
	Acridine rouge
	Safranin O
	Pararosanilin
	Bleu de méthylène
	Calcein acétoxy méthylester (AM)
<b>Hormones stéroïdes</b>	Cortisol
	Aldostérone
	Dexaméthasone

famille de transporteurs à laquelle appartiennent les Pgps (la famille ABC) comprenait également d'autres protéines telles que la MRP (Multidrug Resistance associated Protein) ou la BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) dont la surexpression était impliquée dans le phénomène MDR (Cole *et al.*, 1992 ; Doyle *et al.*, 1998). Une autre famille de transporteurs, celle des « Major Vault Protein » et plus précisément un de ces membres (LRP, Lung Resistance Protein) n'ont été identifiés que plus récemment, mais semblent jouer un rôle important, même s'il reste encore mal défini (Sheper *et al.*, 1993). Enfin des mécanismes cellulaires (détoxication des xénobiotiques, déclenchement de l'apoptose...) se sont montrés capables, par leur activation ou leur inactivation, d'intervenir de manière plus ou moins prépondérante dans l'acquisition et surtout le maintien de la résistance (Lehnert, 1996).

## 2 – Contexte : des implications importantes en médecine

L'échec des traitements par chimiothérapie des cancers chez l'homme est en partie attribué au développement d'une résistance de type MDR. En effet, le caractère de résistance aux traitements est généralement observé lorsque les caractéristiques du phénotype MDR sont développées, aussi bien dans les lignées cellulaires que dans les tumeurs *in vivo* (Gottesman et Pastan, 1993 ; Bosch et Croop, 1996 ; Bradshaw et Arceci, 1998 ; Ambudkar *et al.*, 1999 ; Borst et Oude Elferink, 2002). Dans certaines tumeurs, la résistance est constitutive (cas des cancers du rein et du colon), alors que dans d'autres, elle est acquise après exposition à un agent cytotoxique (cas des cancers des poumons, du sein, des ovaires et de certains lymphomes) (Chan *et al.*, 1996 ; Fisher *et al.*, 1996 ; Goldstein, 1996 ; Lehnert, 1996). Dans tous les cas, les tumeurs développent une résistance croisée vis à vis de nombreux agents cytotoxiques, de structures et de modes d'action très variés, tels que les alcaloïdes de la pervenche, les anthracyclines, les épipodophyllotoxines, les taxanes ou l'actinomycine D (Tableau I).

Plus récemment, des travaux ont soulevé l'existence d'un lien probable entre l'expression du phénotype MDR et la résistance aux traitements utilisés dans la thérapie des malades atteints par le virus VIH-1 (Virus de l'immunodéficience humaine) (Aungst *et al.*, 1999 ; Turriziani *et al.*, 2000). En effet, outre les phénomènes de résistance liés au développement de virus mutants, il semble que le phénotype MDR puisse contribuer à

l'inefficacité des traitements en limitant l'accès des analogues nucléosidiques inhibiteurs de la transcriptase inverse (Yusa *et al.*, 1990 ; Antonelli *et al.*, 1992) et des inhibiteurs de protéases (Alsenz *et al.*, 1998 ; Kim *et al.*, 1998 ; Lee *et al.*, 1998 ; Profit *et al.*, 1999) à leurs cibles cellulaires, limitant ainsi leur action antivirale (Tableau I).

La nécessité de supprimer ce phénotype de résistance ou tout au moins d'en diminuer les effets a suscité le développement de nombreuses études visant à mieux comprendre d'une part les mécanismes fondamentaux régissant le phénotype MDR et d'autre part, les moyens d'action à mettre en œuvre au niveau médical (Beck *et al.*, 1996 ; Ford, 1996 ; Ringbord et Platz, 1996 ; Ojima *et al.*, 1998 ; Persidis, 1999 ; Robert, 1999 ; Krishna et Mayer, 2000 ; Teodori *et al.*, 2002)

## **B – Caractéristiques du phénotype MDR**

L'ensemble des travaux publiés à ce jour permet de définir le concept de résistance MDR comme décrivant un phénotype très complexe. La résistance qui en résulte est due principalement à une réduction de l'accumulation cellulaire des agents cytotoxiques, soit par une limitation de l'absorption, soit par une augmentation de l'efflux de ces composés.

### **1 – Expression accrue des transporteurs membranaires**

#### **1.1 – Transporteurs ABC**

L'origine principale de la résistance de type MDR est la surexpression des transporteurs appartenant à la famille ABC (Hyde *et al.*, 1990 ; Higgins, 1992). Ces transporteurs ont été identifiés à tous les niveaux d'organisation du vivant et contribuent entre autres à l'absorption de nutriments, au transport d'ions et de peptides, à l'excrétion de produits dommageables pour la cellule, à la sécrétion de toxines et à la signalisation cellulaire. La caractéristique commune à tous les membres de la famille ABC est l'utilisation de l'hydrolyse de l'ATP pour fournir l'énergie nécessaire au transport.

Au sein de cette famille, les **Pgps** identifiées par Juliano et Ling en 1976 sont sans conteste les transporteurs les plus étudiés et constituent un facteur prépondérant dans le

développement de la résistance. La section D de cette synthèse bibliographique sera consacrée à une description plus détaillée de ces protéines.

Les MRPs (**Multidrug Resistance-associated Protein**) constituent une autre sous famille au sein des transporteurs ABC (pour revue, Borst *et al.*, 2000b). Un de ses membres, appelé **MRP** ou **MRP1**, est également impliqué dans la résistance de type MDR en favorisant un efflux actif (Cole *et al.*, 1992 ; Grant *et al.*, 1994 ; Zaman *et al.*, 1994 ; Kruh *et al.*, 1994). La MRP est une protéine glycosylée de 190 kD dont la structure présente 15% d'homologie avec celle de la Pgp chez l'homme (Cole *et al.*, 1992). Malgré des caractéristiques communes, ces deux transporteurs présentent toutefois des différences structurales importantes suggérant que les mécanismes intervenant dans l'acquisition et le développement de la résistance soient distincts (Loe *et al.*, 1996). Une différence majeure entre les deux glycoprotéines se situe au niveau de la nature des substrats transportés. A la différence de la Pgp qui prend en charge des composés organiques cationiques ou neutres, la MRP transporte des composés anioniques, soit natifs, soit conjugués au glutathion, aux glucuronates ou aux sulfates (Ishikawa, 1992 ; Muller *et al.*, 1994 ; Jedlitschky *et al.*, 1996 ; Loe *et al.*, 1996 ; Barnouin *et al.*, 1998). Dans le cas des composés non conjugués, il semble que la présence de glutathion soit indispensable à la réalisation du transport. (Versantvoort *et al.*, 1995 ; Zaman *et al.*, 1995 ; Rappa *et al.*, 1997 ; Loe *et al.*, 1998 ; Renes *et al.*, 1999 ; Benderra *et al.*, 2000). La MRP peut également transporter des complexes métalliques conjugués au glutathion (Cole *et al.*, 1994).

La protéine **BCRP** (Breast Cancer Resistance Protein), également baptisée **MXR** (MitoXantrone Resistance), a plus récemment été identifiée comme potentiel intervenant dans les phénomènes de résistance (Doyle *et al.*, 1998). Elle correspond à un demi transporteur ABC susceptible de fonctionner sous forme d'homo ou hétérodimère (Ross, 1998).

Etant donné la taille de la famille ABC, la diversité des fonctions qu'elle assure, et son implication majeure dans de nombreuses pathologies humaines, il n'est pas exclu que d'autres membres encore non identifiés à l'heure actuelle puissent également intervenir dans la mise en place du phénotype de résistance (Loe *et al.*, 1996 ; Borst et Oude Elferink, 2002)

## 1.2 – LRP (Lung Resistance Protein)

La mise en évidence de lignées cellulaires cancéreuses résistantes mais ne surexprimant pas les transporteurs ABC a permis de découvrir la probable implication d'un autre transporteur dans le développement du phénotype MDR (Sheper *et al.*, 1993). Ce transporteur, initialement mis en évidence dans des cellules pulmonaires cancéreuses, a été nommé LRP (Lung Resistance-related Protein ; Sheper *et al.*, 1993). La LRP appartient à la famille des « Major Vault Proteins » qui sont des ribonucléoprotéines dont la fonction reste encore mal connue (Scheffer *et al.*, 1995). Ces protéines sont majoritairement localisées au niveau de vésicules cytoplasmiques, mais une petite partie semble impliquée dans la formation des complexes de pores nucléaires (Rome *et al.*, 1991 ; Chugani *et al.*, 1993). L'implication de la protéine LRP dans le phénotype de résistance a clairement été montrée dans différents tissus cancéreux (Izquierdo *et al.*, 1996) ; elle interviendrait dans la distribution intracellulaire des drogues cytotoxiques en les éliminant du noyau et/ou en les isolant au sein de vésicules cytoplasmiques (Larsen *et al.*, 2000 ; Meschini *et al.*, 2002). La LRP a été identifiée dans des lignées cellulaires cancéreuses et dans des tumeurs *in vivo*, présentant ou non une surexpression des transporteurs ABC (Izquierdo *et al.*, 1996 ; Borg *et al.*, 1998 ; Cheng *et al.*, 2000). Sa surexpression est généralement associée à une inefficacité des traitements anticancéreux mais, à la différence des transporteurs ABC, elle ne semble pas induire à elle seule la résistance. Elle serait plutôt intégrée dans un ensemble de mécanismes favorisant l'acquisition de cette résistance (Borst *et al.*, 1997 ; Bradshaw et Arceci, 1998).

## 2 – Phénomènes connexes

Suite à la découverte d'un phénotype MDR ne présentant pas les caractéristiques de surexpression des transporteurs habituellement incriminés, l'intervention d'autres mécanismes a été suggérée (Marks *et al.*, 1996 ; Hedley *et al.*, 1997 ; Hahn *et al.*, 1999 ; Regev *et al.*, 1999 ; Rieger *et al.*, 2000). Bien que ces mécanismes alternatifs ne soient pas encore complètement identifiés, on sait aujourd'hui que la résistance de type MDR est un phénomène multifactoriel (Lehnert, 1996) montrant typiquement plusieurs altérations phénotypiques dont le résultat favorise la résistance des cellules aux agents cytotoxiques en limitant les interactions agent-cible cellulaire ou en affectant l'action de ces agents.

## 2.1 – Augmentation de la détoxification cellulaire

Parmi les systèmes enzymatiques de phase I, la famille des cytochromes P450 3A, et plus particulièrement l'isoforme 3A4, joue un rôle prépondérant dans le métabolisme des agents thérapeutiques utilisés chez l'homme (Guengerich, 1999). Le CYP3A4 et les Pgps étant exprimés dans les mêmes tissus et partageant de surcroît des substrats communs, l'hypothèse d'une action synergique a été émise (Wacher *et al.*, 1995). En effet, il semble acquis que ces deux systèmes agissent de manière coordonnée pour diminuer les concentrations intracellulaires de xénobiotiques, soit en les métabolisant, soit en les expulsant de la cellule, favorisant ainsi la résistance (Schuetz *et al.*, 1996a, b ; Séré *et al.*, 1998 ; Benet *et al.*, 1999 ; Schuetz *et al.*, 2000).

Les cellules tumorales résistantes sont souvent dotées de systèmes de Phase II particulièrement développés. Ainsi, les glutathion-S-transférases (GST) sont souvent surexprimées dans ces cellules, qui maintiennent un niveau élevé en glutathion intracellulaire (Ramachandra *et al.*, 1995 ; Ringborg et Platz, 1996 ; Krishna et Mayer, 2000). Bien qu'une implication directe des enzymes de conjugaison dans l'acquisition de la résistance soit difficile à établir, il semble qu'elles participent néanmoins à son maintien (O'Brien et Tew, 1996).

## 2.2 – Découplage des voies liant les dommages cellulaires à l'apoptose

Les agents anticancéreux ont généralement pour cible le noyau et l'ADN. En créant des dommages irréparables, ils déclenchent ainsi l'apoptose ou mort cellulaire programmée. L'apoptose constitue la voie prioritaire de destruction biologique des cellules tumorales. Lorsque cette voie est inhibée ou altérée, on assiste à la résistance des cellules aux agents anticancéreux. Ainsi, les gènes p53, p21, bcl-2, bax et bcl-Xs impliqués dans la régulation de l'apoptose et dans les voies de transduction des signaux conduisant à l'apoptose sont généralement altérés dans les cellules résistantes (Hickman, 1996 ; Yu, 1998 ; Ktitorova *et al.*, 2001).

Le gène suppresseur de tumeur p53 est un garant de la stabilité génomique. Il induit en effet l'arrêt du cycle cellulaire ou l'entrée en apoptose en réponse aux dommages à l'ADN occasionnés par les agents cytotoxiques (Lowe *et al.*, 1993, 1994). Il a été montré que



**Tableau II :** Exemples de composés modulateurs de l'activité des Pgps (Données compilées d'après Tsuruo et al., 1981 ; Ford et Hait, 1990 ; Gottesman et Pastan, 1993 ; Bain et al., 1997 ; Seelig, 1998).

Inhibiteurs des canaux calciques	Vérapamil, R-vérapamil
	Nifedipine
	Nicardipine
	Diltiazem
Anti-arythmiques	Quinidine
	Amiodarone
Anti-hypertenseurs	Reserpine
Anti-histaminiques	Terfenadine
Anti-malaria	Quinine
Immunosuppresseurs	Cyclosporine A, SDZ PSC 833
	FK 506
	Rapamycine
Hormones stéroïdes	Progesterone
Stéroïdes modifiés	Tamoxifène
Cations lipophiles	Tetraphénylphosphonium
Diterpènes	Forkolin
Détergents	Tween 80
Antagonistes de la Calmoduline	Trifluoroperazine
	Trfluopromazine

l'expression de la protéine P53 pouvait réprimer l'expression des gènes codant pour les transporteurs Pgps et MRPs (Chin *et al.*, 1992 ; Strauss *et al.*, 1995 ; Wang et Beck, 1998 ; Bähr *et al.*, 2001). En revanche, lorsque cette protéine est mutée ou inactivée, ce qui est généralement le cas dans la majorité des cancers humains (Vogelstein et Kinzler, 1992), la capacité des cellules à entrer en apoptose est réduite, favorisant ainsi l'échec des traitements anticancéreux. De surcroît, l'accumulation de protéines P53 mutées dans le noyau a été corrélée à une expression accrue des Pgps et/ou des MRPs (Chin *et al.*, 1992 ; Strauss *et al.*, 1995 ; Fukushima *et al.*, 1999 ; Park *et al.*, 2001).

D'autres mécanismes contribuent de manière directe ou indirecte au maintien ou à l'amplification du phénomène MDR. Ainsi, la résistance peut également se traduire par une augmentation des capacités des cellules à réparer les dommages causés à l'ADN ou par une altération de la régulation du cycle cellulaire. Enfin, l'altération du fonctionnement de l'enzyme ADN topoisomérase II (clivage de l'ADN stimulé par certains agents cytotoxiques) est également associée aux phénomènes de résistance (Larsen et Skladanowski, 1998). Cependant, l'implication réelle de ces phénomènes dans la résistance n'est encore que très peu comprise (Lehnert, 1996 ; Desoize et Jardillier, 2000 ; Krishna et Mayer, 2000).

## C – La modulation de la résistance MDR

La découverte de composés capables de moduler voire inhiber le phénotype MDR a laissé entrevoir l'espoir de contourner les problèmes de résistance et donc de rétablir la sensibilité des cellules tumorales aux agents anticancéreux (Tsuruo *et al.*, 1981 ; Ford et Hait, 1990 ; Georges *et al.*, 1990 ; Hofslis et Nissen-Meyer, 1990). Le processus de sensibilisation chimique des tumeurs implique la co-administration d'inhibiteurs (ou modulateurs) des transporteurs membranaires et d'agents anticancéreux dans le but d'augmenter l'accumulation cellulaire de ces agents tout en inhibant l'efflux (Sikic *et al.*, 1997 ; Bradshaw et Arceci, 1998 ; Sandor *et al.*, 1998 ; Robert, 1999). La recherche d'inhibiteurs de l'activité des Pgps et dans une moindre mesure des MRPs (Loe *et al.*, 1996), a été particulièrement active et de nombreuses substances sont à l'heure actuelle reconnues comme inhibiteurs (Tableau II). Récemment, un composé capable d'inhiber la résistance liée à la surexpression des LRP a également été découvert (Kitazono *et al.*,

2001). Cependant, des difficultés subsistent quant à l'utilisation clinique de ces composés (Krishna et Mayer, 2000). En effet, ils ne sont efficaces à l'heure actuelle qu'à condition d'utiliser des doses de l'ordre de plusieurs dizaines de micromolaires. Or, l'utilisation de fortes doses pose le problème de la toxicité souvent importante de ces molécules. L'utilisation d'analogues structuraux à toxicité limitée, mais toujours capables de moduler la résistance, a considérablement amélioré les résultats. Par la suite des composés synthétiques ont été élaborés à partir de l'étude de la relation structure-activité. Ces composés synthétiques sont efficaces à des concentrations inférieures au micromolaire, mais n'ont pas encore prouvé leur efficacité lors de tests cliniques sur des tumeurs solides résistantes (Krishna et Mayer, 2000 ; Teodori *et al.*, 2002).

Des travaux ont également été entrepris dans le but de rechercher des composés cytotoxiques non transportés par les protéines membranaires d'efflux (Ojima *et al.*, 1998 ; Roovers *et al.*, 1999 ; Takara *et al.*, 2000).

Malgré les efforts réalisés pour améliorer les protocoles de sensibilisation chimique des tumeurs, la résistance de type MDR n'est toujours pas un problème résolu et les chercheurs se sont penchés sur l'étude de nouvelles stratégies afin de la réduire (Baguley, 2002).

Un des problèmes majeurs de l'utilisation des inhibiteurs classiques reste la sensibilisation des cellules non cibles (cerveau, cellules hématopoïétiques, etc.). Un axe de recherche s'est développé dans le but de protéger ces cellules en utilisant la transfection de vecteurs rétroviraux codant pour des transporteurs mutants. Le maintien de la résistance dans les cellules non cibles permettrait de traiter les tumeurs avec une combinaison agent cytotoxique/inhibiteur à des doses plus efficaces en limitant les risques pour les autres tissus (Baudard *et al.*, 1996 ; Licht *et al.*, 1996 ; Hafkemeyer *et al.*, 2000). Une autre stratégie consiste à bloquer la synthèse des transporteurs soit en fixant des oligonucléotides sur les ARN messagers (ARNm), soit en utilisant des ribozymes qui permettent le clivage de ces ARNm (Bouffard *et al.*, 1996 ; Ojima *et al.*, 1998). Des travaux ont également proposé d'inhiber l'action des transporteurs membranaires, et notamment des Pgps, en empêchant leur maturation au cours de la biosynthèse dans le réticulum endoplasmique (Loo et Clarke, 1999b). Des perspectives sont également ouvertes en ce qui concerne la possibilité d'inhiber la transcription des gènes codant pour les transporteurs (Labialle *et al.*, 2002 ; Xu *et al.*, 2002).

**Tableau III : Nomenclature couramment utilisée afin de désigner les gènes codant pour les Pgps chez les mammifères (d'après Borst et Schinkel, 1997).**

	Transporteurs MDR		Translocateurs de phosphatidylcholine
	Classe I	Classe II	Classe III
Homme	mdr 1		mdr 3 (mdr 2)
Souris	mdr 1a (mdr 3)	mdr 1b (mdr1)	mdr 2
Rat	mdr 1a	mdr 1b	mdr 2
Hamster	pgp 1	pgp 2	pgp 3

L'immunothérapie est également recensée comme un moyen de restaurer la sensibilité des cellules résistantes en activant les effecteurs de la réponse immunitaire et en augmentant la susceptibilité des cellules cancéreuses (Nishisaka *et al.*, 1997 ; Shtil *et al.*, 1999).

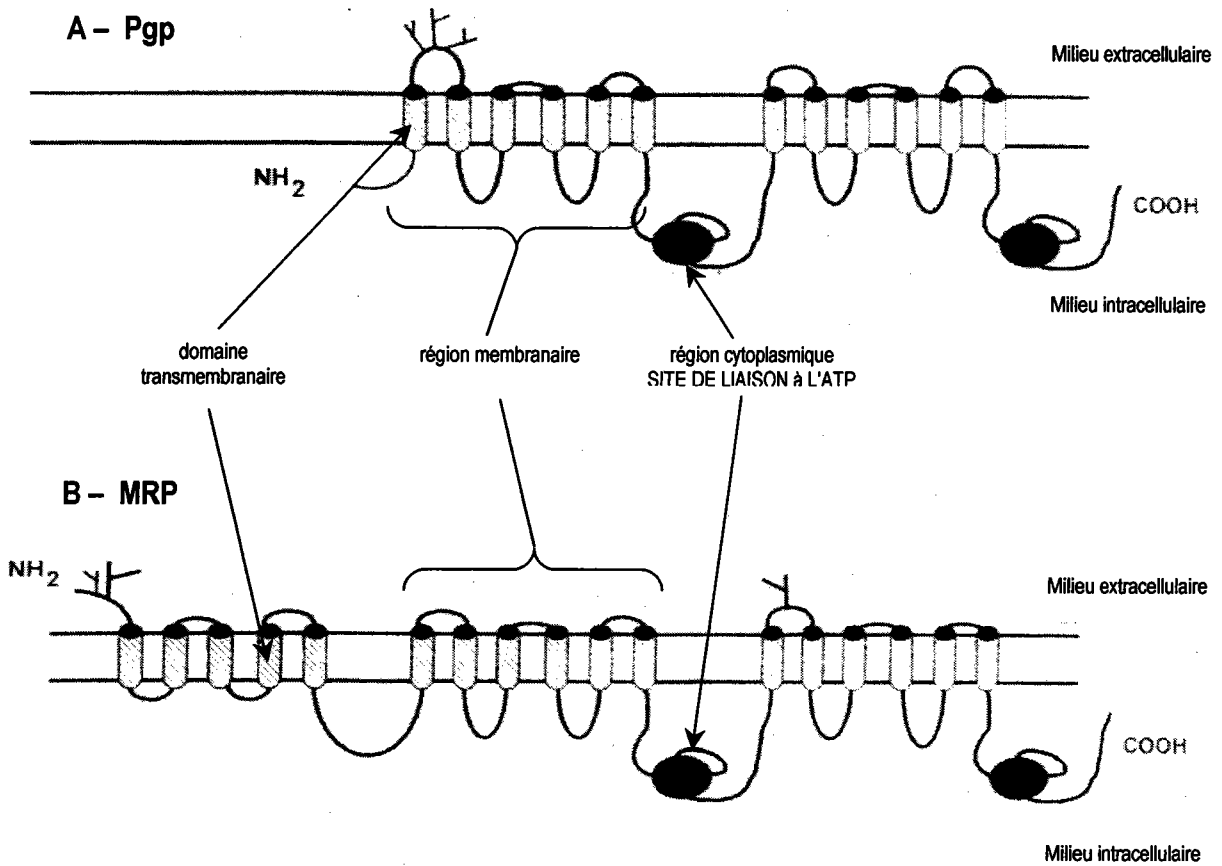
D'autres stratégies sont développées dans le but de restaurer l'efficacité des voies de transduction des signaux menant à l'apoptose afin de définitivement éliminer les cellules cancéreuses (Reed, 2001). Une autre solution étudiée consiste à limiter la prolifération des cellules tumorales afin d'augmenter l'efficacité des traitements (Baguley, 2002).

L'ensemble de ces techniques sont des domaines de recherche relativement récents et bien que les résultats obtenus *in vitro* soient prometteurs, leur efficacité *in vivo* n'est pas encore démontrée.

## **D – Les P-glycoprotéines (Pgps) chez les mammifères**

### **1 – Les Pgps, une petite famille multigénique**

Les gènes codant pour les Pgps sont regroupés au sein d'une petite famille multigénique comprenant trois isoformes chez les rongeurs (classes I, II et III) et deux isoformes chez l'homme (classes I et III) (Tableau III). Les Pgps de classes I et II sont toutes deux associées au phénomène MDR, alors que les Pgps de classe III sont impliquées dans la translocation de la phosphatidylcholine vers la bile (Borst et Schinkel, 1997). En 1995, un gène appartenant à la famille des transporteurs ABC et présentant une grande similitude avec les Pgps, a été identifié chez le rat (Childs *et al.*, 1995). Le produit de ce gène, appelé Pgp soeur (spgp, sister Pgp) est localisé au niveau des canalicules hépatiques et serait un transporteur de sels biliaires (Gerloff *et al.*, 1998). Son éventuelle implication dans le développement de la résistance de type MDR n'est pas connue (Török *et al.*, 1999 ; Lecureur *et al.*, 2000).



**Figure 1 : Structure de deux transporteurs ABC (A, Pgp ; B, MRP).**

La structure fonctionnelle de base comprend deux régions membranaires (constituées de 6 domaines transmembranaires) et deux régions cytoplasmiques de liaison à l'ATP. La position des chaînes glucidiques est indiquée par le symbole  $\gamma$  (modifié d'après Borst et al., 2000).

*Dans la suite de ce document, le terme de P-glycoprotéine ou Pgp sera utilisé pour désigner les produits des gènes de Classe I et II, impliqués dans l'acquisition de la résistance de type MDR chez les mammifères.*

## 2 – Structure et taille des Pgps

Malgré la diversité régnant au sein de la famille des transporteurs ABC, certains éléments structuraux sont communs à tous ses membres. Ainsi, la structure fonctionnelle minimale est constituée de 2 régions transmembranaires et 2 sites de liaison à l'ATP (Holland et Blight, 1999 ; Jones et George, 1999 ; Klein *et al.*, 1999 ; Borst *et al.*, 2000a). La figure 1 présente la structure de deux transporteurs ABC, la Pgp et la MRP. Particulièrement étudiée chez les mammifères, la Pgp est décrite comme une protéine constituée de deux parties homologues reliées entre elles au niveau d'une courte séquence d'acides aminés chargés nommée « linker region ». Chacune des deux parties comprend un domaine N-terminal hydrophobe associé à la membrane, comprenant six domaines transmembranaires reliés entre eux par des boucles alternativement extra et intracellulaires et un domaine C-terminal hydrophile, contenant un site cytosolique de liaison à l'ATP. La protéine comprend au total 2 sites de liaisons à l'ATP et 12 domaines transmembranaires possédant une structure secondaire en hélice  $\alpha$ . La première boucle extracellulaire porte plusieurs sites de N-glycosylation (Figure 1). La longueur totale de la chaîne polypeptidique est estimée à 1280 acides aminés, ce qui correspond à une protéine de 140kDa atteignant 170kDa lorsqu'elle est glycosylée (pour revue : Endicott et Ling, 1989 ; Gottesman et Pastan, 1993 ; Germann et Chambers, 1998 ; Ambudkar *et al.*, 1999).

La Pgp se présente comme une structure double qui semble être le résultat de la duplication d'un gène ancestral (Endicott et Ling, 1989 ; Gottesman et Pastan, 1993 ; Germann et Chambers, 1998). Cette structure double a suggéré l'hypothèse que les deux moitiés puissent fonctionner de manière indépendante. Loo et Clarke ont apporté quelques éléments de réponse en montrant que chacune des moitiés de la Pgp exprimée comme deux polypeptides séparés présentait une faible activité ATP-asiq, mais n'était pas capable d'induire une résistance dans des cellules en culture. Le couplage de l'activité ATP-asiq et du transport des substrats nécessite donc l'interaction entre les deux moitiés des Pgps (Loo et Clarke, 1994). En 1996, ces mêmes auteurs montrent que la structure fonctionnelle

de base est un monomère (Loo et Clarke, 1996). La plupart des auteurs considèrent en effet que l'unité de base est la protéine de 170kDa fonctionnant comme un monomère (Hrycyna et Gottesman, 1998). Cependant, d'autres études ont suggéré que les Pgps de 170kDa puissent s'associer et fonctionner en dimère de 340kDa, voire en oligomère (Boscoboinik *et al.*, 1990 ; Naito et Tsuruo, 1992 ; Bosch et Croop, 1998 ; Germann et Chambers, 1998).

### 3 – Fonctionnement des Pgps

Les Pgps présentent la particularité de pouvoir prendre en charge une très grande variété de composés organiques de structure et de propriétés chimiques très différentes. Il est à noter que même si les Pgps sont capables de transporter des composés synthétiques, de très nombreux substrats sont des substances naturelles utilisées en pharmacologie, telles que les anthracyclines ou les alcaloïdes de la pervenche (Tableau I). Devant cette large spécificité ou apparente non spécificité, des équipes de recherche se sont penchées sur l'étude de la relation structure-activité afin de déterminer les éléments structuraux communs et caractéristiques de tous les substrats des Pgps, en tentant de définir les facteurs permettant de distinguer les substrats transportés, les substrats liés, mais non transportés, les inducteurs et les inhibiteurs.

#### 3.1 – Reconnaissance des substrats

A l'heure actuelle, les seuls points communs véritablement établis entre tous les substrats sont un caractère modérément hydrophobe, amphipathique, un poids moléculaire faible, la présence de noyaux aromatiques plans, d'azote et enfin, un caractère neutre ou cationique. (Zamora *et al.*, 1988 ; Endicott et Ling, 1989 ; Pearce *et al.*, 1989 ; Bain *et al.*, 1997). En 1998, Seelig a défini que les éléments de reconnaissance sont formés par des entités de deux ou trois groupes donneurs d'électrons, respectivement nommées type I et type II et caractérisées par une distance spatiale fixe entre les différents groupes. Ces groupes semblent intervenir dans la formation de liaisons hydrogène entre le substrat et le transporteur. D'après cet auteur, les unités de type I interviendraient dans la reconnaissance des substrats par les Pgps alors que les unités de type II caractériseraient les substrats inducteurs des Pgps, c'est à dire les substrats responsables de leur surexpression, et donc,



du développement de la résistance dans les cellules tumorales. Ces travaux précisent également que si deux composés sont appliqués simultanément, celui qui possède la plus grande aptitude à former des liaisons hydrogènes agit généralement comme un inhibiteur (Seelig, 1998 ; Seelig et Landwojtowicz, 2000).

### 3.2 – Sites de liaison aux substrats

L'étude de l'interaction des Pgps avec leurs substrats a permis de déterminer le nombre de sites de liaisons, la localisation de ces sites et leur éventuelle spécificité dans le but de mieux comprendre le mode d'action de ces transporteurs (Germann et Chambers, 1998). Afin d'y parvenir, deux approches majeures ont été mises en œuvre.

L'utilisation d'agents cytotoxiques et de modulateurs pour l'étude des liaisons par marquage (photoaffinité) a permis de mettre en évidence la participation des domaines transmembranaires (DTs) 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12 dans la liaison des Pgps à leurs substrats (Bruggemann *et al.*, 1989 ; Greenberger *et al.*, 1991 ; Morris *et al.*, 1994 ; Hafkemeyer *et al.*, 1998).

Une autre approche consiste à analyser des Pgps mutées (mutagenèse dirigée) afin de déterminer l'implication des différents acides aminés dans l'interaction Pgp/substrat. L'ensemble de ces travaux a permis l'identification de régions majeures pour l'interaction avec les substrats, à l'intérieur ou à proximité des DTs 5, 6, 11 et 12 (Kajiji *et al.*, 1993 ; Hafkemeyer *et al.*, 1998 ; Zhou *et al.*, 1999 ; Loo et Clarke, 1999c, d, 2000, 2001).

Les DTs étant chacun impliqués de manière plus ou moins spécifique dans la liaison et/ou le transport de certains composés substrats, il a été suggéré que les Pgps soient dotées de plusieurs sites de liaison présentant une spécificité plus ou moins marquée pour un type de substrat. Ainsi, la présence d'au moins deux sites de liaison, l'un présentant une affinité marquée pour la vinblastine et l'autre étant plus spécifique du vérapamil et de la quinidine a été montrée par Ayesh *et al.* (1996). De la même manière, Boer *et al.* (1996) ont mis en évidence plusieurs sites de liaison, probablement proches, mais distincts, pour différents composés de la famille des dihydropyridines. D'autres travaux se basant sur l'étude de l'activité ATP-ase des Pgps et de sa modulation par différents composés ont permis de rejeter définitivement l'hypothèse de la présence d'un site de liaison unique et de montrer

la pertinence d'un modèle multi-site (Orlowski *et al.*, 1996 ; Pascaud *et al.*, 1998 ; Orlowski et Garrigos, 1999). Shapiro *et al.* (1999) ont plus récemment mis en évidence l'existence d'un troisième site de liaison, spécifique de la prazosine et de la progestérone. La liaison des substrats sur ce site ne semble pas provoquer leur transport, mais stimulerait celui de substrats fixés sur les deux autres sites. Selon ces auteurs, ce troisième site serait un site de régulation de l'activité de transport des Pgps (Shapiro *et al.*, 1999).

La présence d'au moins deux sites de liaison et leur répartition (un dans chaque moitié de la Pgp) a suggéré la possibilité que les deux moitiés puissent interagir et se rejoindre par le biais de changements conformationnels en formant un pore (Rosenberg *et al.*, 1997 ; Germann et Chambers, 1998). Cette hypothèse est appuyée par les travaux de Loo et Clarke, qui ont démontré entre autre, que les deux parties de la protéine sont indispensables à l'activité ATPasique des Pgps (Loo et Clarke, 1994).

### **3.3 – Hydrolyse de l'ATP**

Les premières expérimentations utilisant des cellules de phénotype MDR ont révélé que les Pgps sont dépendantes de l'hydrolyse de l'ATP pour assurer leur fonction de transporteur (Dano, 1973). En effet, l'inhibition de la synthèse d'ATP par blocage de la respiration mitochondriale entraîne l'accumulation des composés organiques dans les cellules présentant le phénotype MDR. Cette accumulation traduit l'inaptitude des Pgps à expulser ces composés hors de la cellule. A l'inverse, la restauration des niveaux d'ATP réduit l'accumulation des composés organiques (Dano, 1973). Grâce à l'utilisation d'analogues radioactifs et photoactivables de l'ATP, différents auteurs ont mis en évidence la liaison directe de l'ATP à la protéine (pour revue, Germann et Chambers, 1998). De plus, Cornwell *et al.* (1987) ont montré que les sites de liaison à l'ATP sont distincts des autres sites de liaison connus.

#### **3.3.1 – Site de liaison à l'ATP : la cassette ABC**

Les deux sites de liaisons à l'ATP présentent une structure primaire caractéristique de tous les transporteurs ABC. Ce sont deux séquences d'environ 200 acides aminés qui

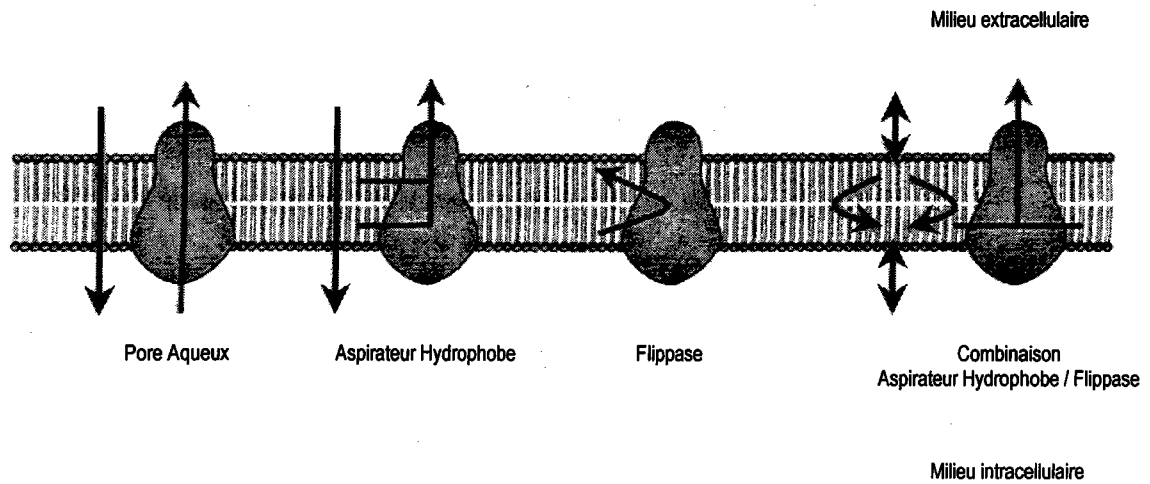
constituent les cassettes de liaison à l'ATP (ABC, ATP Binding Cassette, Higgins, 1992 ; Hyde *et al.*, 1990). Aux deux extrémités de la cassette ABC se situent deux motifs hautement conservés au cours de l'évolution, Walker A et Walker B, et qui se sont révélés indispensables à la liaison de l'ATP (Walker *et al.*, 1982). La cassette ABC comprend un troisième motif peptidique spécifique des transporteurs ABC, qu'on appelle en conséquence la « signature ABC » (Klein *et al.*, 1999).

Il a été montré que la présence et l'intégrité des deux sites de liaison à l'ATP étaient indispensables pour la réalisation du transport (Senior *et al.*, 1995). Hrycyna *et al.* (1999) ont par la suite précisé que ces deux sites étaient asymétriques en mettant en évidence leur différence de comportement vis à vis du marquage par un analogue radioactif de l'ATP.

### 3.3.2 – Hydrolyse de l'ATP et changements conformationnels

Les Pgps présentent une activité ATPasique intrinsèque, même en absence de composés substrats à transporter. Cette activité est amplifiée par la liaison des substrats sur le transporteur (Shapiro et Ling, 1994, 1997).

Senior *et al.* (1995) ont été les premiers à proposer un schéma du déroulement du cycle catalytique des Pgps, qui se basait sur l'alternance de l'hydrolyse de l'ATP sur chacun des deux sites de liaison. Sauna et Ambudkar (2000) ont complété et modifié ce schéma en montrant que deux ATP sont nécessaires à la réalisation d'un seul cycle, corroborant ainsi la stoechiométrie mesurée de deux molécules d'ATP hydrolysées pour une molécule de substrat transportée (Ambudkar *et al.*, 1997, Shapiro et Ling, 1998). Ainsi, l'hydrolyse (ou seulement la liaison ; Martin *et al.*, 2000) du premier ATP sur un des deux sites « choisi » de manière aléatoire engendre un changement de conformation de la Pgp qui permet la libération du substrat préalablement lié. L'hydrolyse du second ATP permet à la Pgp de retrouver sa conformation initiale, c'est à dire une conformation lui permettant de lier une nouvelle molécule substrat (Sauna et Ambudkar, 2001 ; Sauna *et al.*, 2001). L'étape de libération de l'ADP et du phosphate inorganique suite à l'hydrolyse de l'ATP s'avère être un facteur limitant du cycle catalytique dans le sens où, sans libération de ces produits, le cycle ne pourrait se poursuivre jusqu'à l'étape suivante (Kerr *et al.*, 2001).



**Figure 2 :** Illustration des principaux modèles proposés pour expliquer le transport des substrats par les Pgps. Les flèches grises représentent les voies d'entrée des substrats dans la cellule (diffusion passive, flip flop) et les flèches noires, les voies d'expulsion de ces substrats par la Pgp (d'après Tutundjian, 2001).

### 3.4 – Mécanisme de transport

Le mécanisme par lequel les Pgps transportent leurs substrats est longtemps resté obscur. Même si la question n'est toujours pas résolue à l'heure actuelle, plusieurs hypothèses faisant intervenir des mécanismes directs ou indirects ont été émises pour tenter de l'expliquer.

Une des hypothèses suggérait un mécanisme indirect par lequel les Pgps réduiraient la concentration intracellulaire des agents cytotoxiques soit par altération du potentiel électrique membranaire, soit par augmentation du pH intracellulaire. Ces modifications produisant un changement de réactivité chimique, elles favoriseraient l'excrétion des composés organiques (Roepe, 1995 ; Wadkins et Roepe, 1997). Bien que ces phénomènes puissent contribuer à modifier les paramètres de l'accumulation cellulaire de certains composés, ils ne peuvent expliquer l'acquisition d'une résistance de type MDR. Ce modèle a par conséquent été écarté, d'autant plus que l'existence d'une interaction directe entre les Pgps et leurs substrats a clairement été montrée (Raviv *et al.*, 1990).

L'intervention d'un mécanisme direct décrivant la Pgp comme une pompe membranaire interagissant avec les substrats transportés a semblé plus probable. L'ensemble des données expérimentales, des données structurales, ainsi que la mise en évidence de la structure tridimensionnelle des Pgps (Rosenberg *et al.*, 1997) appuient cette hypothèse et sont en faveur d'un modèle de pompe membranaire subissant des modifications de conformation pour former un pore permettant l'expulsion des substrats vers le milieu extracellulaire (Figure 2).

Le modèle classique de pompe membranaire (formation d'un pore aqueux et transport de composés hydrophiles) s'est toutefois avéré insuffisant pour expliquer toute la complexité du fonctionnement des Pgps et notamment la nature hydrophobe et la grande diversité de ses substrats. Trois principales hypothèses ont tenté de l'adapter et de l'améliorer, afin qu'il réponde au particularisme des Pgps.

Constatant que la réduction de l'accumulation intracellulaire des composés cytotoxiques semblait être due à la fois à une diminution de l'entrée et à une augmentation de l'efflux de ces composés, certains auteurs ont supposé que les Pgps puissent extraire leurs substrats dès leur entrée dans la cellule, c'est à dire au niveau des feuillettes interne et externe de la

membrane plasmique (Figure 2 ; Higgins et Gottesman, 1992 ; Homolya *et al.*, 1993). Bien qu'elle ne soit pas unanimement acceptée (Altenberg *et al.*, 1994), cette hypothèse est la base d'un modèle considérant les Pgps comme un « aspirateur hydrophobe » (hydrophobic vacuum cleaner ; Raviv *et al.*, 1990 ; Gottesman et Pastan, 1993).

Selon Higgins et Gottesman (1992), les Pgps seraient des flippases, capables de transloquer les molécules interceptées dans la membrane du feuillet interne vers le feuillet externe contre un gradient intramembranaire (figure 2).

Un troisième modèle a plus récemment été développé par Eytan et Kuchel (1999). Il combine les deux hypothèses citées précédemment et se base sur des observations montrant des vitesses de passage de la membrane variables en fonction de la nature des composés testés. Ainsi, Eytan *et al.* (1996) observent que le transport des composés modulateurs de la résistance MDR est plus rapide que celui des composés cytotoxiques. Regev et Eytan (1997) ont étudié les paramètres régissant le passage de la doxorubicine au travers de la membrane plasmique et ont abouti à la conclusion que ce transport semblait mieux décrit par un mécanisme de flip flop lent que par un mécanisme de diffusion passive. Suite à ces travaux, un nouveau modèle a été proposé pour décrire le mécanisme d'action des Pgps (Eytan et Kuchel, 1999). Les substrats pénétreraient lentement dans la membrane par flip flop du feuillet externe vers le feuillet interne, duquel ils seraient extraits selon le modèle de l'aspirateur hydrophobe (figure 2). En ce qui concerne les modulateurs, ils pénétreraient rapidement par diffusion passive, trop rapidement pour être pris en charge par les Pgps. Cette accumulation de composés inhibiteurs conduirait à une saturation des Pgps, et en conséquence, à une inhibition de l'efflux d'autres composés.

### 3.5 – Régulation de l'expression des Pgps

La surexpression des P-glycoprotéines peut survenir par le biais de plusieurs mécanismes, dont l'amplification génique et les contrôles transcriptionnels et post-traductionnels.

L'amplification génique a été mise en évidence dans certaines lignées cellulaires résistantes (Roninson *et al.*, 1986), mais elle ne semble pas systématique. En effet, la surexpression des Pgps peut survenir sans augmentation du nombre de copies du gène

(Shen et al., 1986) et se traduit parfois uniquement par une augmentation des taux d'ARN messager (ARNm) et de protéines (Fardel et al., 1994). Il semble que le mécanisme de régulation le plus probable soit une régulation transcriptionnelle (Scotto et al., 1986 ; Lee, 2001), mettant en jeu à la fois des facteurs constitutifs (facteurs de transcription, oncogènes, gènes suppresseurs de tumeurs) et des facteurs externes inductibles (stress, choc thermique, cancérogènes, agents anticancéreux) (Scotto et Egan, 1998). Le troisième type de régulation de l'expression des Pgps correspond à un contrôle post-traductionnel, tel que la phosphorylation.

La présence de sites de phosphorylation hautement conservés dans les « linker region » des Pgps a suggéré l'intervention de ce mécanisme dans la régulation du fonctionnement des pompes (Germann et al., 1995 ; Sachs et al., 1999). De plus, une phosphorylation importante a été associée à l'augmentation de leur capacité d'efflux et à la résistance des cellules étudiées (Center, 1985). D'après ces travaux, la phosphorylation interviendrait suite à l'activation d'une protéine kinase C (PKC).

Ces observations ont été confirmées grâce à des expérimentations évaluant l'effet d'activateurs et d'inhibiteurs des PKC sur le transport de substrats par les Pgps. Les résultats suggèrent que l'activation de la phosphorylation favorise une augmentation de l'efflux (Hamada et al., 1987 ; Fine et al., 1988 ; Chambers et al., 1990). Au contraire, l'inhibition de la phosphorylation engendre une réduction de l'efflux des substrats (Gupta et al., 1994, 1996 ; Merritt et al., 1999 ; Conseil et al., 2001).

Cependant, des résultats obtenus par mutagénèse suggèrent que la phosphorylation ne soit pas essentielle au fonctionnement des Pgps puisque des mutants dépourvus de sites de phosphorylation sont tout de même capables d'exercer leur rôle de transport au même titre que les sauvages (Germann et al., 1996). En supposant que les Pgps aient un niveau d'activité basal qui puisse être augmenté par la phosphorylation, les cellules qui expriment fortement les Pgps ont une capacité de transport suffisante, sans que l'intervention de la phosphorylation soit nécessaire. La phosphorylation pourrait alors jouer un rôle important quand les niveaux d'expression des Pgps sont faibles, ou bien quand les concentrations en substrats varient de manière importante et que des modifications rapides de l'activité d'excrétion sont nécessaires (Germann et Chambers, 1998). Szabo et al. (1997) émettent l'hypothèse selon laquelle la phosphorylation pourrait moduler l'activité ATPase en augmentant l'affinité apparente pour certains composés, notamment à de faibles concentrations.

## 4 – Localisation et fonctions physiologiques des Pgps

### 4.1 – Protection contre les xénobiotiques

Les Pgps sont un facteur déterminant du processus MDR. Mais au delà de leur rôle au niveau des cellules tumorales, leur présence a également été mise en évidence dans les tissus sains, notamment au niveau des membranes apicales des épithéliums polarisés. En effet, les Pgps sont exprimées au niveau des cellules intestinales, qui sont un site majeur d'absorption des toxines alimentaires. Elles sont également présentes dans le foie (membrane des canalicules hépatiques) et dans le rein (bordure en brosse des tubules proximaux), où elles contribuent à l'excrétion des xénobiotiques (Ichikawa *et al.*, 1991 ; Borst et Schinkel, 1997 ; Schinkel, 1997). La fonction majeure des Pgps consiste à protéger l'organisme contre de nombreux toxiques, d'une part en limitant l'absorption dans le tractus digestif, et d'autre part, en stimulant l'excrétion dans le foie et les reins. De plus, les Pgps semblent jouer un rôle primordial dans la protection d'organes particulièrement sensibles ; elles sont en effet fortement exprimées au niveau de la barrière hématoencéphalique qui protège le cerveau des fluctuations de la composition du sang circulant, et donc, des toxiques qui peuvent s'y trouver (Jonker *et al.*, 1999 ; Schinkel, 1999 ; Terasaki et Hosoya, 1999 ; Fromm, 2000).

La plupart des données concernant les fonctions physiologiques des Pgps ont été acquises grâce à des approches génétiques, principalement en étudiant des souris dépourvues des gènes *mdr1a* et *mdr1b* (Classes I et II). Ces souris sont viables, fertiles, et ne présentent aucune anomalie phénotypique si ce n'est une hypersensibilité aux agents cytotoxiques, due à la capacité réduite des organismes à éliminer ces agents (Borst et Schinkel, 1996, 1997 ; Schinkel, 1997). Ces résultats ont permis d'avancer l'idée que la principale fonction des Pgps de classes I et II est une fonction de protection des organismes contre les xénobiotiques.

### 4.2 – Transport de substrats endogènes

Au delà de la fonction protectrice, les Pgps semblent jouer un rôle dans le transport de composés endogènes. Elles sont entre autre exprimées dans les glandes surrénales, dans le



placenta, l'endomètre utérin et les ovaires (Thiebaut *et al.*, 1987), où elles sont capables de transporter certains stéroïdes (Ueda *et al.*, 1992). Les Pgps sont également présentes dans les membranes des cellules de la moelle osseuse (cellules hématopoïétiques primaires), où elles pourraient être impliquées dans le transport de facteurs de croissance nécessaires à la différenciation des éléments figurés du sang. Présentes aussi dans certains leucocytes (Natural Killers et lymphocytes T cytotoxiques), elles auraient pour fonction de libérer dans le milieu extracellulaire des protéines cytolytiques (Schinkel, 1997 ; N'cho *et al.*, 1999 ; Johnstone *et al.*, 2000). Des travaux ont également montré que les Pgps pourraient être impliquées dans la translocation de lipides endogènes et dans l'estérification du cholestérol membranaire, mais ces hypothèses restent encore à confirmer (Bosch *et al.*, 1997 ; Luker *et al.*, 1999 ; Johnstone *et al.*, 2000)

### 4.3 – Autres fonctions physiologiques

Les Pgps apparaissent également impliquées dans d'autres fonctions physiologiques annexes, telles que l'activation de canaux chloriques et la régulation du volume cellulaire (Valverde, 1996). Bien que les premières hypothèses aient supposé une intervention directe des Pgps dans ces mécanismes, il apparaît maintenant que si elles interviennent, c'est de manière indirecte, en régulant un canal chlorique encore non identifié (Wang *et al.*, 1998 ; Idriss *et al.*, 2000 ; Johnstone *et al.*, 2000).

La présence de Pgps dans les tissus sains ainsi que leur fonction de protection contre les toxines laisse entrevoir l'importance d'un tel mécanisme. Les Pgps et autres systèmes associés semblent représenter un mécanisme de défense constitutive, de protection des organismes contre les agressions chimiques. Qu'en est-il dans les populations naturelles d'organismes vivants, constamment exposées aux agressions toxiques, soit naturelles (toxines animales et végétales), soit anthropiques (lutte biologique, pollution des écosystèmes) ? Existe-t-il un mécanisme analogue à la résistance MDR, permettant de se protéger contre les agressions du milieu ?

Sur la base de la bibliographie actuelle, nous allons tenter d'apporter des éléments de réponse à ces questions dans la deuxième partie de cette analyse bibliographique

## II – Le mécanisme de résistance multidroque (MDR), un système de défense universel dans le règne vivant ?

Les transporteurs ABC n'interviennent pas seulement dans l'acquisition de la résistance de type MDR chez les mammifères. Ils ont été identifiés à tous les niveaux d'organisation du règne vivant, où ils assurent des fonctions aussi variées que l'absorption de nutriments, le transport d'ions et de peptides, l'excrétion de métabolites, la sécrétion de toxines ou la signalisation cellulaire. Il s'est toutefois avéré que certains des membres de cette famille, identifiés chez des organismes aussi divers que des bactéries, des protozoaires, des champignons ou des poissons, étaient impliqués dans la protection des cellules contre des toxines animales ou végétales, des médicaments antiparasitaires ou des pesticides. L'analogie supposée entre ces mécanismes de défense cellulaire et le système MDR a clairement été démontrée dans de nombreux cas, appuyant l'hypothèse de l'universalité du phénomène MDR (Bosch et Croop, 1998 ; Hrycyna et Gottesman, 1998).

### A – Les procaryotes

Les **bactéries** peuvent devenir résistantes aux antibiotiques et aux agents anticancéreux par le biais de plusieurs mécanismes comprenant l'inactivation de ces molécules par hydrolyse, l'altération des cibles cellulaires et l'efflux actif. Les transporteurs impliqués dans les systèmes d'efflux bactériens appartiennent à diverses familles (MFS, Major Facilitator Superfamily ; RND, Resistance-Nodulation-Division ; SMR, Small Multidrug Resistance) dont la famille ABC (Lolkema *et al.*, 1998 ; Nikaido, 1998). Les membres de la famille ABC sont essentiellement impliqués dans l'absorption de nutriments et dans l'excrétion de toxines. Chez certaines bactéries, des homologues de la famille MDR ont été identifiés. Ainsi, le transporteur LMRA identifié chez *Lactococcus lactis* (van Veen *et al.*, 1996) présente une forte homologie avec la Pgp mammalienne et confère une résistance aux antibiotiques dont les caractéristiques sont similaires à celles décrites dans le cas du phénotype MDR (van Veen *et al.*, 1999).

## B – Les eucaryotes

### 1 – Les protozoaires

Les protozoaires parasites sont la cause d'un grand nombre de maladies dans le monde et posent un réel problème de santé dans la mesure où ils deviennent de plus en plus résistants aux traitements médicaux utilisés. Le plus connu de ces parasites est probablement *Plasmodium falciparum*, l'agent causal de la malaria. Les traitements anti-malaria sont souvent voués à l'échec du fait du développement d'une résistance de type MDR vis à vis des agents thérapeutiques utilisés (chloroquine, méfloquine, quinine ; Martin *et al.*, 1987). Un homologue des Pgps a été mis en évidence (PFMDR1) et son rôle dans la résistance aux agents anti-malaria a clairement été démontré (Foote *et al.*, 1989 ; Wilson *et al.*, 1989 ; Ruetz *et al.*, 1996). *Entamoeba histolytica* est responsable du développement d'amibiases parfois mortelles. L'échec des traitements basés sur l'utilisation de métronidazole et d'émétine a été attribué à une résistance de type MDR (Orozco *et al.*, 1999). Quatre gènes de la famille MDR ont été mis en évidence chez ce parasite (Ehpgp1, Ehpgp2, Ehpgp4 et Ehpgp5) (Descotteaux *et al.*, 1992, 1995).

### 2 – Les levures et champignons

Les levures sont également dotées de systèmes de transports de type ABC, parmi lesquels certains homologues des Pgps ont été identifiés. Ainsi, les transporteurs PDR5 (Balzi *et al.*, 1994) et SNQ2 (Servos *et al.*, 1993) identifiés chez *Saccharomyces cerevisiae* et PMDR1<sup>+</sup> chez *Schizosaccharomyces pombe* (Nishi *et al.*, 1992) sont responsables d'une résistance accrue à la valinomycine et à la leptomycine B respectivement. De même, la surexpression des transporteurs CDR1 et CDR2 entraîne chez le pathogène *Candida albicans* le développement d'une résistance vis à vis de divers composés, notamment les antifongiques de type azole (Prasad *et al.*, 1995 ; Gupta *et al.*, 1998).

Chez les champignons, les données sur les transporteurs ABC et les phénomènes de résistance sont encore assez limitées. Une résistance aux fongicides présentant des propriétés caractéristiques du phénomène MDR a toutefois été mise en évidence chez un champignon filamenteux, *Aspergillus nidulans* (Del Sorbo *et al.*, 1997). La résistance

observée est corrélée avec une induction de l'expression de deux protéines ABC (ATRA et ATRB) et avec un accroissement des capacités d'efflux. Chez *Penicillium digitatum*, un gène (*pmr1*) codant pour un transporteur ABC apparemment impliqué dans un phénomène de résistance de type MDR a également été caractérisé (Nakaune *et al.*, 1998). La fonction physiologique des transporteurs ABC chez les champignons filamenteux correspond à une fonction de protection contre les toxines naturelles, qui aurait probablement évolué pour s'adapter aux fongicides (de Waard, 1997).

### 3 – Les Végétaux

Jusqu'au début des années 1990, aucune donnée concernant les transporteurs ABC n'était disponible chez les végétaux. Depuis, la recherche d'un système analogue au système MDR a été initiée à partir du constat que certaines espèces développaient une résistance croisée vis à vis de différents herbicides. A ce jour, une vingtaine de protéines ABC ont été identifiées, parmi lesquelles se trouvent quelques homologues végétaux des Pgps. Ainsi, des homologues ont été identifiés chez *Arabidopsis thaliana* (AtPGP1 et AtPGP2 ; Dudler et Hertig, 1992), chez la pomme de terre (PMDR1 ; Theodoulou, 2000) et chez l'orge *Hordeum vulgare* (HvMDR1 et HvMDR2 ; Davies *et al.*, 1997). Des membres de la famille MRP ont également été identifiés chez les végétaux, chez lesquels ils semblent être impliqués dans la détoxification des xénobiotiques lipophiles tels que les herbicides, en assurant le transport des métabolites conjugués au glutathion dans des vacuoles de stockage (système de phase III ; Theodoulou, 2000).

### 4 – Les Animaux

#### 4.1 – Les Vertébrés

L'étude des transporteurs ABC est très développée chez **l'homme** du fait de leur implication dans le phénomène MDR (ce chapitre, § I) mais également dans un certain nombre de manifestations pathologiques, notamment certaines maladies génétiques comme la mucoviscidose (CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), l'hyperinsulinisme familial (SUR, sulfonylurea receptor), le syndrome de Dubin-Johnson

(cMOAT, canalicular multispecific organic anion transporter) ou l'adénoleucodystrophie (ALD, adenoleucodystrophy protein) (Mourez *et al.*, 2000). Ainsi de nombreux travaux ont été développés chez l'homme, mais également chez d'autres **mammifères** comme la souris, le rat, le hamster, ou le lapin (Kajikawa *et al.*, 1999).

Un gène ABC appartenant à la famille MDR a également été mis en évidence chez les **oiseaux** (poulet ; Edelmann *et al.*, 1999).

Un système analogue au système MDR a également été mis en évidence **chez les poissons**. Par analogie avec ce système, il a été appelé **MXR** pour « MultiXenobiotic Resistance » ou résistance multixénobiotique. Pour les raisons citées en introduction de ce travail, nous le désignerons par **MDMX** pour « Mécanisme de Défense MultiXénobiotique ».

Chez les poissons, l'approche mise en œuvre est une approche environnementale et s'oriente vers la détection et la caractérisation du MDMX et de son implication pour l'interprétation des données écotoxicologiques.

Des gènes apparentés à la famille MDR ont été identifiés chez la plie *Pleuronectes americanus* (Chan *et al.*, 1992), le fundule *Fundulus heteroclitus* (Cooper *et al.*, 2000) et le turbot *Scophthalmus maximus* (Tutundjian, 2001).

Les techniques immunochimiques utilisant l'anticorps monoclonal C219 ont permis la mise en évidence de protéines homologues des Pgps mammaliennes (Pgps-like) de taille avoisinant 170kDa dans le foie de *Fundulus heteroclitus* et *Anoparchus sp.* (Bard, 2000). Des Pgps-like sont également exprimées chez le guppy *Poecilia reticulata* dans différents tissus dont l'intestin et les branchies (Hemmer *et al.*, 1995). Chez *Ictalurus punctatus*, Kleinow *et al.* (2000) ont mis en évidence l'expression de Pgps-like dans l'intestin, mais cette expression s'est révélée variable en fonction de la région intestinale étudiée. Récemment, un système de type MDMX a été caractérisé chez le turbot *Scophthalmus maximus* (Tutundjian, 2001 ; Tutundjian *et al.*, 2002a). Ces travaux ont mis en évidence l'expression d'une Pgp-like de 83kDa, qui pourrait correspondre à un demi transporteur.

Des travaux similaires ont également été effectués chez des poissons présentant des tumeurs, notamment au niveau du foie. Ainsi, l'expression des Pgps-like dans les tissus

hépatiques cancéreux de *Fundulus heteroclitus* provenant de sites contaminés était 2 à 3 fois plus élevée que dans les tissus hépatiques sains des témoins (Cooper, 1999). Le même type d'observation a été reporté dans le cas de lésions hépatiques cancéreuses chez le flet *Platichthys flesus* (Köhler *et al.*, 1998a). En revanche, une étude réalisée sur des plies (*Pleuronectes americanus*) provenant de sites fortement contaminés par des hydrocarbures aromatiques et des métaux lourds a montré des résultats assez inhabituels. En effet, les Pgps-like n'ont pas été détectées dans les poissons sains et leur expression n'a été mise en évidence que dans 13% des tumeurs. En revanche, l'expression s'est révélée être très élevée dans les canalicules biliaires et les tissus sains de 80% des poissons présentant des tumeurs (Bard, 2000). Pour expliquer cette apparente incohérence, les auteurs ont avancé l'hypothèse selon laquelle les tissus tumoraux pourraient induire l'augmentation de l'expression dans les tissus sains, afin de déclencher la mise en place d'un système de défense au niveau de ces tissus (Bard, 2000).

Outre l'étude immunochimique de l'expression des protéines, quelques études ont mis en évidence de manière directe l'activité MDMX chez les poissons. Ainsi, Karnaky *et al.* (1993) ont montré la présence d'un efflux actif de rhodamine 123 inhibé par la réserpine au niveau des cellules à chlorures des branchies du fundule. Chez ce même poisson, Miller (1995) a mis en évidence l'existence d'une fonction de sécrétion d'un substrat du MDMX vers la lumière des tubules proximaux du rein, cette fonction pouvant être inhibée par les modulateurs MDR. Les travaux de Sturm *et al.* (2001) ont montré la présence d'un mécanisme d'efflux actif inhibé par le vérapamil dans les hépatocytes de la truite arc en ciel *Oncorhynchus mykiss*. Au cours d'une étude sur la réponse de plusieurs biomarqueurs chez des organismes marins prélevés *in situ*, Bresler *et al.* (1999) ont mis en évidence la présence et l'activité d'un mécanisme MDMX dans les branchies, les reins et le foie de *Platichthys flesus* et *Limanda limanda* en mer du Nord. Albertus et Laine (2001) ont caractérisé un système de type MDMX dans les hépatocytes du fundule ; ces auteurs confirment les similitudes existant entre ce système et le système MDR identifié dans les lignées cellulaires cancéreuses et soulignent l'intérêt de l'utilisation de la réponse d'un tel système en tant qu'indicateur du stress toxique subi par les poissons dans leur environnement naturel.

Les connaissances acquises chez les poissons confirment que le MDMX et les protéines associées constituent un système de défense de première ligne qui semble intervenir en

amont des enzymes de détoxification et notamment en amont des enzymes de Phase I telles que les monooxygénases à cytochrome P450. Etant donné que les Pgps et les cytochromes P450 sont souvent exprimés dans les mêmes tissus, certains auteurs ont cherché à corrélérer leurs expressions dans ces tissus. Ainsi Bard (2000) reporte une forte corrélation entre l'expression des Pgps-like et du CYP1A dans les tissus hépatiques de poissons (*Anoplarchus sp.*) contaminés par des hydrocarbures. Cependant, aucune corrélation n'a pu être établie chez des individus exposés à un inducteur type des CYP1A ( $\beta$ -naphtoflavone). De la même manière, aucune corrélation n'a pu être établie chez des fundules (*Fundulus heteroclitus*) exposés à des composés inducteurs des CYP1A, le tetrachlorodibenzofurane (Bard, 2000) et le 3-méthylcholanthrène (Cooper, 1999).

Bien que les données soient encore relativement limitées, les études précédemment décrites démontrent la présence et la fonctionnalité d'un système de type MDMX présentant des caractéristiques analogues à celles définies dans les cas de la résistance.

#### 4.2 – Les Invertébrés

Chez ces organismes, les travaux publiés portent sur l'étude de populations naturelles et s'inscrivent essentiellement dans une approche environnementale. La mise en évidence de MDMX chez ces organismes est réalisée par deux types d'approche : une approche fonctionnelle qui consiste à mesurer directement l'activité MDMX et une approche immunologique qui permet la détection de protéines Pgps-like, proches de celles connues chez les mammifères. Ces méthodes ont permis la mise en évidence d'un ou plusieurs éléments caractéristiques de la présence d'un système de type MDMX chez divers organismes, notamment chez *Caenorhabditis elegans* (Broeks *et al.*, 1995), *Chironomus riparius* (Podsiadlowski *et al.*, 1998), *Carcinus maenas* (Köhler *et al.*, 1998b), *Drosophila melanogaster* (Wu *et al.*, 1991). Mais les données sont particulièrement abondantes chez les invertébrés aquatiques, notamment chez les Mollusques Bivalves et Gastéropodes. Le MDMX a notamment été mis en évidence chez un certain nombre d'espèces indicatrices ou sentinelles. L'étude du MDMX chez les invertébrés aquatiques a pour objectif d'une part de comprendre comment les organismes réagissent et font face à des événements de pollution aiguë ou chronique, et d'autre part, de définir des outils de diagnostic de la qualité des milieux et de l'état de santé des biota.

C'est en 1989 qu'une équipe croate se penche sur l'existence d'un phénotype de résistance chez des bivalves (Kurelec et Pivcevic, 1989). Cette équipe part du constat que certaines espèces ou certaines populations animales sont capables de survivre et de se reproduire normalement dans des écosystèmes particulièrement endommagés par des pollutions d'origine anthropique. Il est alors suggéré qu'il puisse exister chez ces organismes un mécanisme analogue au système MDR qui leur permettent de résister à l'impact toxique des polluants rencontrés dans les milieux naturels. Un mécanisme MDMX, analogue au système MDR, a ainsi été mis en évidence chez un bivalve dulçaquicole (*Anodonta cygnea* ; Kurelec et Pivcevic, 1989).

La présence et/ou le fonctionnement du MDMX ont par la suite été montrés par diverses techniques chez de nombreuses espèces aquatiques marines ou dulçaquicoles, telles que des éponges, des vers annélides, ainsi que chez des mollusques bivalves et gastéropodes (revue dans Bard, 2000). Seules une espèce de gastéropode (Kurelec *et al.*, 1995b) et quelques espèces d'échinodermes (oursins et étoiles de mer ; Toomey et Epel, 1993 ; Epel, 1998 ; Hamdoun *et al.*, 2002) semblent dépourvues de système de type MDMX puisqu'aucune des caractéristiques habituelles n'a pu être identifiée chez les adultes, les embryons et les larves de ces organismes. Bien que les données disponibles à l'heure actuelle soient peut-être encore trop réduites (Epel, 1998), certains auteurs ont avancé l'hypothèse selon laquelle ce système puisse exister de manière constitutive chez toutes les espèces, sauf chez les plus pollusensibles (Kurelec, 1992 ; Kurelec *et al.*, 1995b) ou dans les premiers stades de développement (Minier *et al.*, 2002). Epel (1998) souligne la possibilité que le MDMX n'intervienne que chez les organismes ayant un mode de vie et/ou un mode de nutrition les exposant particulièrement aux toxines naturelles et aux polluants anthropiques. C'est le cas des organismes filtreurs (éponges, bivalves) et des organismes benthiques toujours en contact avec les sédiments (poisson de fond, bivalves endogés). Une autre hypothèse avancée est celle de l'existence de très faibles niveaux de MDMX chez tous les organismes aquatiques, qu'on ne puisse détecter que lorsqu'ils sont anormalement élevés. A la lumière du faible nombre de données acquises jusqu'à présent, il semble difficile de conclure sur cette question et toutes les hypothèses restent encore à considérer.

La fonction reconnue du MDMX chez les organismes aquatiques est la protection contre les toxines naturelles ou anthropiques par l'efflux de ces composés. Pour le moment aucune étude ne s'est penchée sur l'existence chez ces organismes d'autres fonctions telles



qu'il en existe chez les mammifères et les micro-organismes, à savoir le transport de nutriments ou de composés endogènes.

L'ensemble des travaux recensés précédemment montre que les systèmes MDR / MDMX, s'ils ne sont pas tout à fait universels, semblent toutefois remplir une fonction primordiale de défense contre les xénobiotiques dans une très large variété d'organismes. La partie suivante de cette analyse bibliographique est consacrée à l'étude du MDMX chez les mollusques bivalves dans l'optique d'en dégager les propriétés intéressantes pour le développement d'un biomarqueur d'exposition des organismes à la pollution de leur milieu.

### III – Le Mécanisme de Défense MultiXénobiotique (MDMX) chez les Bivalves

#### A – Localisation tissulaire

La présence du MDMX a été mise en évidence au niveau de tissus particulièrement exposés à la pollution de leur milieu (branchies, manteau) ou impliqués dans la détoxification des contaminants assimilés par les organismes (glande digestive). Ainsi, Kurelec et Pivcevic (1989) ont montré la présence d'un MDMX fonctionnel au niveau du manteau, des branchies et de la glande digestive chez *Anodonta cygnea*. Chez l'huître *Crassostrea gigas*, le MDMX a été mis en évidence au niveau des tissus embryonnaires et larvaires et, chez les adultes, au niveau des branchies et du manteau (Keppler et Ringwood, 2001a ; Minier *et al.*, 2002). Chez le bivalve marin *Mytilus edulis*, la présence de gènes apparentés à la famille MDR a été détectée dans les tissus branchiaux et dans le manteau (Minier et Galgani, 1995). Chez les embryons et les larves de cette espèce, une activité de transport de la rhodamine B inhibée par le vérapamil a été mise en évidence (McFazden *et al.*, 2000). Minier et Moore ont montré en 1996 l'existence et le fonctionnement du MDMX dans les membranes lysosomales des hémocytes chez la moule *Mytilus sp.* par un test de rejet de la rhodamine B. Bien que ces quelques exemples montrent l'étude du MDMX dans différents tissus, il est à noter que la plupart des auteurs travaillent quasiment exclusivement sur les tissus branchiaux (Bard, 2000). Ces tissus étant en contact direct avec la pollution des milieux aquatiques, ils sont en effet susceptibles de présenter les systèmes de défense les plus développés et donc, les niveaux de MDMX les plus forts.

#### B – Aspects moléculaires et biochimiques

##### 1 – Gènes, protéines et mécanisme d'action du MDMX

Très peu d'études sont entièrement consacrées à la description des aspects biochimiques associés au MDMX et la majorité des connaissances actuelles a été acquise par comparaison et analogie avec les transporteurs décrits chez les mammifères.

**Tableau IV : Le MDMX chez les bivalves au niveau de différents tissus chez les adultes (branchies, Br ; manteau, M ; hépatopancréas, HP ; hémocytes, Hém) et chez les embryons (E), les larves (L ; trocophores, Lt ; véligères, Lv ; pédivéligères, Lpv) ou les juvéniles (Juv). Le MDMX a été mis en évidence par les méthodes de binding, d'accumulation, d'efflux, par des techniques de biologie moléculaire (BM), ou par Western blot (WB, anticorps utilisé, (monoclonal, M ou polyclonal P)). Les tailles des fragments d'ADNc obtenus (paire de bases, pb) en biologie moléculaire et les tailles des protéines détectées par Western blot (kDa) sont indiquées dans la colonne « résultats ». Les résultats des travaux utilisant les autres méthodes sont résumés par un signe + lorsque un ou plusieurs éléments attestant de l'existence du système MDMX ont été détectés et par un signe – lorsque aucun de ces éléments n'a pu être mis en évidence.**

Organisme	Tissu	Méthodes	Résultats	Références
<b>Bivalves Marins</b>				
<i>Mytilus edulis</i>	Br	WB C219 (M)	220 / 240 kDa	Minier et al. , 1993
	Br	BM	+	
	Br	BM	350 / 2500 pb	Minier et Galgani, 1996
	Hém	Accumulation	+	Minier et Moore, 1996, 1998
	Hém	WB C219 (M)	170 kDa	Minier et Moore, 1996
	E / L	Accumulation	+	McFazden et al. , 2000
<i>Mytilus californianus</i>	Br	WB Ab-1 (P) / C219 (M)	170 kDa	Cornwall et al. , 1995
	Br	Accumulation / Efflux	+	
	Br	WB C219 (M)	170 kDa	Eufemia et Epel, 1998, 2000
	Br	Accumulation	+	
	Br	Accumulation / Efflux	+	Eufemia et al. , 2002
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Br, M, HP	Binding / Accumulation	+	Kurelec et Pivcevic, 1991
	Br	Accumulation	+	Kurelec, 1995b
	Br	WB C219 (M)	145 / 220 / 240 kDa	Galgani et al. , 1996
	Br	Accumulation / Efflux	+	
	Br	WB Anti-C (P)	140 kDa	Kurelec et al. , 1996a
	Br	Accumulation	+	
	Br	WB Anti-C (P)	140 kDa	Smital et al. , 2000b
	Br	Accumulation / Efflux	+	
	Br	WB C219 (M)	(50 / 70) 130 / 230 kDa	Minier et al. , 2000
	Br	WB C219 (M)	+	Grimm et al. , 2000
<i>Perna perna</i>	Br	BM	+	
<i>Crassostrea gigas</i>	Br	WB C219 (M)	220 / 240 kDa	Minier et al. , 1993
	Br	BM	+	
	Br	Accumulation	+	Minier et al. , 2002
	O	BM	-	
	Lt	BM	-	
	Lv	BM	233 pb	
	Lpv	BM	233 pb	
<i>Crassostrea virginica</i>	Juv	BM	233 pb	
	Br	WB C219 (M)	170 kDa	Keppler et Ringwood, 2001a, b
	E	Accumulation	+	Keppler et Ringwood, 2001a
<b>Bivalves Dulçaquicoles</b>				
<i>Anodonta cygnea</i>	Br, M, HP	Binding	+	Kurelec et Pivcevic, 1989
	Br	WB JSB1 (M)	116-125 kDa	Bonfanti et al. , 1998
	Br	WB Anti-C (P)	-	Smital et al. , 2000b
	Br	Accumulation / Efflux	+	
<i>Corbicula fluminea</i>	Br	WB C219 (M)	135 kDa	Waldmann et al. , 1995
	Br	WB Anti-C (P)	(85) / 135 kDa	
	Br	Binding / Accumulation	+	
	Br	Accumulation	+	Kurelec et al. , 1996b
<i>Dreissena polymorpha</i>	Br	WB Anti-C (P)	-	Smital et al. , 2000b
	Br	Accumulation / Efflux	+	Smital et Kurelec, 1997
	Br	Accumulation	+	Schröder et al. , 1998
	Br	WB C219 (M)	120 kDa	Jaouen et al. , 2000

Sur le plan génétique, les seules données disponibles à l'heure actuelle concernent trois espèces marines (Tableau IV). Chez la moule bleue *Mytilus edulis* et l'huître du Pacifique *Crassostrea gigas*, Minier *et al.* (1993) ont mis en évidence la présence de gènes apparentés aux gènes *mdr* par hybridation de l'ADN génomique avec un oligonucléotide présentant une séquence hautement conservée au sein de la famille des Pgps. Par la suite, l'amplification de séquences d'ADN complémentaires a confirmé l'existence de gènes apparentés à la famille MDR chez ces deux espèces marines (Minier et Galgani, 1995 ; Minier *et al.*, 2002).

Les protéines responsables du fonctionnement du MDMX chez les bivalves sont reconnues par les anticorps fabriqués contre les Pgps mammaliennes, suggérant une certaine homologie entre ces protéines. Cependant aucune autre donnée structurale ne vient confirmer cette homologie supposée. Les seules données disponibles sont fournies par les techniques immunologiques, qui permettent de déterminer la taille de la (des) protéine(s) Pgp-like (Tableau IV). Chez les bivalves, des Pgps-like ont été identifiées dans les tissus branchiaux. Une protéine avoisinant 140kDa a été détectée chez les organismes dulçaquicoles *Corbicula fluminea* (Waldmann *et al.*, 1995) et *Anodonta cygnea* (Bonfanti *et al.*, 1998) alors que chez *Dreissena polymorpha*, la protéine détectée atteint seulement 120 kDa (Jaouen *et al.*, 2000). Chez les bivalves marins, le nombre de protéines détectées varie de 1 à 2 chez les huîtres *Crassostrea sp.* (Minier *et al.*, 1993 ; Keppler et Ringwood, 2001a) et de 1 à 3 chez les moules marines *Mytilus sp.* (Minier *et al.*, 1993 ; Cornwall *et al.*, 1995 ; Galgani *et al.*, 1996 ; Minier *et al.*, 2000). Dans tous les cas, les tailles des protéines immunoréactives s'échelonnent entre 120et 240kDa ; la variabilité de ces résultats reflète probablement des variations du taux de glycosylation des protéines. Les travaux de Waldman *et al.* (1995) chez *Corbicula fluminea* et Minier *et al.* (2000) chez *Mytilus galloprovincialis* soulignent la présence dans certains échantillons de faibles quantités de protéines atteignant 50 à 85kDa. Ces protéines sont généralement considérées comme des produits de dégradation ou de réactions non spécifiques. Cependant, certains auteurs ayant obtenu ce type de résultats chez les poissons, évoquent la possibilité de l'existence de demi-transporteurs fonctionnant sous forme de dimère (Tutundjian *et al.*, 2002a). Néanmoins, l'hypothèse de la survenue d'un clivage de la protéine au cours de la préparation n'a pu être écartée, soulignant alors la fragilité de ces protéines et peut-être la nécessité d'optimiser les protocoles de préparation des échantillons chez certains organismes.

Chez les mammifères, la régulation de l'expression des Pgps semble être liée à une étape de phosphorylation faisant intervenir une protéine kinase C (PKC) (Center, 1985). L'implication de la phosphorylation dans la régulation de l'expression des Pgps-like chez les bivalves a également été abordée. Des travaux effectués chez des espèces marine (*Mytilus galloprovincialis* ; Kurelec, 1995b) et dulçaquicole (*Corbicula fluminea* ; Waldmann *et al.*, 1995) ont montré que les inhibiteurs des PKC engendraient une inhibition de l'activité d'efflux du MDMX, appuyant l'hypothèse de l'intervention de la phosphorylation dans la régulation de ce système chez les bivalves.

Le transport des composés substrats par les Pgps mammaliennes est déclenché par la liaison de ces molécules sur un ou plusieurs sites spécifiques localisés sur la protéine membranaire (pour revue, Germann et Chambers, 1998). Chez les bivalves, la liaison de composés substrats a été mise en évidence et la mesure de cette liaison (« binding ») est couramment utilisée comme méthode d'évaluation de la présence du mécanisme MDMX chez ces organismes (Kurelec et Pivcevic, 1989, 1991 ; Kurelec *et al.*, 1995b ; Waldmann *et al.*, 1995 ; ce chapitre, § III-C-1.1).

Les Pgps sont dépendantes de l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP pour assurer leur fonction de transporteur. Chez les bivalves, la présence d'une activité ATPasique associée au fonctionnement du MDMX a également été mise en évidence (Kurelec et Pivcevic, 1991 ; Waldman *et al.*, 1995) ; la mesure de cette activité constituant un témoin du fonctionnement du MDMX, elle a été exploitée en tant que méthode d'évaluation indirecte de son activité (Parant et Pain, 2001 ; ce chapitre, § III-C-1.2).

## 2 – Substrats et Inhibiteurs (Modulateurs) du MDMX

Les nombreux travaux réalisés dans le domaine de la lutte contre la résistance de type MDR dans les cellules cancéreuses de mammifères ont montré que les Pgps peuvent transporter une très grande variété de composés organiques de structures et de propriétés chimiques très différentes (ce chapitre, § I Tableau I). Chez les bivalves, aucune étude théorique n'est disponible en ce qui concerne les substrats du MDMX. Cependant plusieurs auteurs ont utilisé des substrats reconnus du système MDR lors d'expérimentations menées chez les bivalves. Ils ont pu observer une interaction avec l'activité MDMX des bivalves,

**Tableau V : Composés naturels ou anthropiques interagissant avec le MDMX. Les données ont été acquises selon des méthodes fonctionnelles permettant la mise en évidence d'un effet sur l'activité de transport MDMX ou selon des méthodes mettant en œuvre l'étude des relations structure-activité.**

	Types de composé	Références
COMPOSES NATURELS	Extraits bactériens	
	<i>Vibrio harveji</i>	Toomey <i>et al.</i> , 1996
	<i>Vibrio vulnificus</i>	
	<i>Shewanella putrefaciens</i>	
	Algues et extraits algaux	
	Algues macrophytiques	
	<i>Gracilaria sjoestedtii</i>	Eufemia <i>et al.</i> , 2002
	<i>Macrocystis pyrifera</i>	
	<i>Gigartina</i> sp.	
	<i>Phyllospadix scouleri</i>	
	<i>Egregia menziesii</i>	Smital <i>et al.</i> , 1996 ; Schröder <i>et al.</i> , 1998
	<i>Caulerpa taxifolia</i>	Schröder <i>et al.</i> , 1998
	<i>Caulerpa racemosa</i>	
	Algues phytoplanctoniques	
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Eufemia <i>et al.</i> , 2002
	<i>Pseudonitzschia pungens</i>	
	<i>Alexandrium catanella</i>	
CONTAMINANTS ENVIRONNEMENTAUX	Pesticides	
	Azinphos éthyl	Bain <i>et al.</i> , 1997
	Chlorbenside	Cornwall <i>et al.</i> , 1995 ; Galgani <i>et al.</i> , 1996
	Chlorpyrifos	Bain et Leblanc, 1996
	Chlorthion	
	Coumaphos	Bain <i>et al.</i> , 1997
	Dachtal : DCPA (diméthyl-2,3,5,6-tétrachlorotéréphtalate)	Cornwall <i>et al.</i> , 1995 ; Galgani <i>et al.</i> , 1996
	DDD (1,1-dichloro-2,2-bis( <i>p</i> - chlorophényl)-ethane)	Galgani <i>et al.</i> , 1996
	DDE (1,1-dichloro-2,2-bis( <i>p</i> - chlorophényl)-ethylene)	
	DDT (bis(chlorophényl)-trichloroéthane)	
	Endosulfan	Bain et Leblanc, 1996
	Heptachlore	
	Parathion	
	Pentachlorophénol (PCP)	Cornwall <i>et al.</i> , 1995 ; Galgani <i>et al.</i> , 1996
	Phénamiphos	Bain et Leblanc, 1996
	Phosalone	Bain <i>et al.</i> , 1997
	Prochloraz	Sturm <i>et al.</i> , 2001
	Simazine	Minier et Moore, 1998
	Sulfallate (CEDC : N'-(2-chloro-allyl)diéthylidithiocarbamate)	Cornwall <i>et al.</i> , 1995 ; Galgani <i>et al.</i> , 1996
	Polychlorobiphényles	
	Arochlor 1254	Galgani <i>et al.</i> , 1996
	Hydrocarbures	
	2-acétylaminoanthracène	Waldman <i>et al.</i> , 1995
	2-acétylaminofluorène	Kurelec et Pivcevic, 1989
	7,12-diméthylbenz[ <i>a</i> ]anthracène	Yeh <i>et al.</i> , 1992
	Benzo[ <i>a</i> ]pyrène	Yeh <i>et al.</i> , 1992 ; Minier <i>et al.</i> , 2002
	Diesel - 2 - oil	Kurelec <i>et al.</i> , 1995b
	Pétrole brut	Hamdoun <i>et al.</i> , 2002
	Alkyles phénols	
	Nonylphénol diéthoxylate	Sturm <i>et al.</i> , 2001

ce qui atteste de leur qualité de substrats chez ces organismes. Sur la base de ces données, l'étude du MDMX chez les organismes bivalves a été menée en développant des méthodes de mesure qui utilisent ces composés substrats et inhibiteurs. Ainsi, les colorants fluorescents tels que les rhodamines B et 123 (Toomey et Epel, 1993 ; Cornwall *et al.*, 1995 ; Galgani *et al.*, 1996 ; Smital et Kurelec, 1997, 1998b ; Eufemia et Epel, 2000 ; McFazden *et al.*, 2000), les anthracyclines (Kurelec *et al.*, 1992) et les alcaloïdes de la pervenche (Kurelec, 1995b ; Waldmann *et al.*, 1995 ; Kurelec *et al.*, 1996a, b) sont couramment utilisés comme substrats des Pgps-like. De la même manière, les composés inhibiteurs tels que le vérapamil ou la cyclosporine A sont utilisés pour moduler l'activité de transport (Kurelec et Pivcevic, 1989, 1991 ; Kurelec, 1995b ; Kurelec *et al.*, 1996a, b ; Waldmann *et al.*, 1995 ; Smital et Kurelec, 1997).

Différents types de substrats environnementaux, c'est à dire de substrats naturels ou anthropiques présents dans les milieux naturels et donc susceptibles d'interagir avec le MDMX, ont été mis en évidence dans le cadre de l'étude du MDMX chez les organismes aquatiques (Tableau V). Ces études ont notamment permis de déterminer le potentiel substrat de substances naturelles. Toomey *et al.* (1996) ont ainsi montré que des bactéries marines localisées dans l'intestin du ver *Urechis caupo* produisaient des composés substrats du MDMX, capables de moduler l'activité de transport chez les embryons de cette espèce. Les algues produisent également des composés susceptibles de moduler l'activité de transport du MDMX chez les bivalves (Schröder *et al.*, 1998 ; Eufemia *et al.*, 2002).

Outre les substances naturelles, les contaminants environnementaux d'origine anthropique (hydrocarbures, pesticides, etc.) peuvent également être substrats du MDMX (Tableau V). Plusieurs polluants environnementaux ont été testés pour leur capacité à moduler l'activité de transport du MDMX chez les bivalves (Toomey et Epel, 1995 ; Minier et Moore, 1998 ; Smital *et al.*, 2000a ; Minier *et al.*, 2002). Ainsi, des composés modérément hydrophobes (dacthal, sulfallate et pentachlorophénol) se sont avérés substrats chez deux espèces de bivalves marins *Mytilus californianus* (Cornwall *et al.*, 1995) et *Mytilus galloprovincialis* (Galgani *et al.*, 1996). En revanche, les résultats obtenus pour les composés fortement hydrophobes (DDT, DDD, DDE, Arochlor 1254) différaient selon les études. Alors que Cornwall *et al.* (1995) montrent que ces composés n'affectent pas l'activité de transport chez *Mytilus californianus*, l'étude réalisée par Galgani *et al.* (1996) démontre au contraire que ces composés sont des substrats potentiels du MDMX chez

*Mytilus galloprovincialis*. Les auteurs suggèrent que ces différences de comportement pourraient être dues soit à des conditions expérimentales différentes (concentrations, solubilité, toxicité des produits), soit à une variabilité des réponses spécifique aux espèces. Malgré des résultats parfois contradictoires, l'ensemble de la littérature considère généralement que les composés modérément hydrophobes sont de bons substrats, alors que les composés très hydrophobes ne sont que de très médiocres substrats.

Parmi les hydrocarbures, le 2-acétylamino fluorène et le 2-aminoanthracène ont été montrés comme interagissant avec le MDMX chez deux espèces dulçaquicoles *Dreissena polymorpha* et *Corbicula fluminea* (Kurelec, 1995a ; Kurelec *et al.*, 1996b ; Waldmann *et al.*, 1995 ; Britvic et Kurelec, 1999). En revanche, le benzo[a]pyrène s'est révélé n'être qu'un piètre substrat du MDMX chez l'huître *Crassostrea gigas* (Minier *et al.*, 2002). Un mélange d'hydrocarbures appelé « diesel-2-oil » est également substrat du MDMX. Il provoque une induction rapide du système chez *Monodonta turbinata* (Kurelec *et al.*, 1995b) (Tableau V).

D'autres études ont montré que des échantillons prélevés dans les milieux naturels, tels que des concentrés d'eau ou des extraits de sédiments, contenaient des composés capables de moduler l'activité de transport MDMX, et donc des composés potentiellement substrats ou inhibiteurs compétitifs (Toomey et Epel, 1993 ; Smital et Kurelec, 1997 ; Kurelec *et al.*, 1998).

L'interaction des métaux avec le MDMX n'est à l'heure actuelle que très peu étudiée. Alors que Minier *et al.* n'ont pu relier le profil d'induction de l'expression de Pgps-like chez l'huître *Crassostrea gigas* à un profil de contamination métallique, des travaux réalisés chez l'annélide polychète *Nereis diversicolor* ont suggéré l'existence d'un système de type MDMX réagissant à l'intoxication par le cadmium et l'arsenic (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1997). Les travaux de Eufemia et Epel (2000) ont également montré que le chlorure de cadmium et l'arsénite de sodium, bien que n'étant pas substrats du MDMX, était toutefois capables d'induire son activité. A l'heure actuelle, les connaissances sur ce sujet sont extrêmement restreintes et si les métaux semblent capables d'influencer le MDMX, ils ne semblent pas être substrats du MDMX.



## C – Méthodes d'évaluation de l'activité MDMX chez les bivalves

### 1 – Méthodes indirectes

#### 1.1 – Mesure de la fixation des substrats ou « binding »

La mesure du taux de liaison d'un substrat radioactif sur des préparations membranaires permet de quantifier les sites de fixation accessibles, et donc d'estimer la quantité de protéines impliquées dans l'activité MDMX présentée par le tissu étudié (Horio *et al.*, 1988). Pour cela, des vésicules membranaires sont préparées, soit à partir des tissus branchiaux ou digestifs (*Anodonta cygnea*, Kurelec et Pivcevic, 1989 ; *Mytilus galloprovincialis*, Kurelec et Pivcevic, 1991 ; *Monodonta turbinata*, Kurelec *et al.*, 1995b ; *Corbicula fluminea*, Waldmann *et al.*, 1995), soit à partir de l'organisme entier (*Geodia cydonium*, *Verongia aerophorba*, Kurelec *et al.*, 1992) selon la méthode décrite par Riordan et Ling (1979). Les vésicules membranaires sont incubées dans un milieu contenant un substrat radiomarké, tel que le 2-acétylaminofluorène marqué au carbone 14 ( $^{14}\text{C}$ -AAF) ou la vincristine tritiée ( $^3\text{H}$ -VCR). Les liaisons totales et non spécifiques des produits radiomarkés sont évaluées selon Cornwell *et al.* (1986) pour le  $^{14}\text{C}$ -AAF et selon Naito *et al.* (1988) pour la  $^3\text{H}$ -VCR. L'ensemble de ces travaux a montré que la liaison mesurée est saturable, sensible à la trypsine et au vérapamil. L'inconvénient majeur de cette technique est qu'elle donne une mesure statique des capacités des cellules à lier les substrats, et qu'elle ne permet en aucun cas de corréler cette mesure à l'activité MDMX.

#### 1.2 – Mesure de l'activité ATPasique associée à l'activité MDMX

Le transport actif des substrats par la voie MDMX s'accompagne de la production de phosphate inorganique (Pi) consécutive à l'hydrolyse de l'ATP. L'activité ATPasique peut être évaluée par une méthode colorimétrique (Parant et Pain, 2001) qui permet d'estimer de manière indirecte l'activation du MDMX en mesurant la quantité de Pi produit. Cette méthode présente l'inconvénient majeur de ne permettre l'obtention que de faibles signaux en raison d'un bruit de fond généralement important. Bien que cette méthode ne soit pas suffisamment sensible pour permettre son utilisation unique dans le cadre d'études

*in situ*, elle peut constituer un complément d'information et venir confirmer l'activation du MDMX (Parant et Pain, 2001).

### 1.3 – Mesure Immunochimique

Plusieurs anticorps monoclonaux et polyclonaux ont été décrits pour la détection des protéines de la famille MDR (Beck *et al.*, 1996) ; le plus utilisé reste sans nul doute l'anticorps monoclonal C219. Cet anticorps a permis la détection de protéines MDR/MDMX chez de nombreux organismes, allant des mammifères jusqu'à une grande variété d'invertébrés et même d'organismes végétaux. Il est dirigé contre une séquence épitope hautement conservée qui est située dans la région cytoplasmique de la moitié C-terminale de la Pgp et plus particulièrement à proximité du site de l'activité ATPasique (Georges *et al.*, 1990 ; van den Elsen, 1999). Cet anticorps présente l'avantage de détecter toutes les isoformes identifiées chez les mammifères (Kartner *et al.*, 1985), facilitant ainsi la détection d'homologues chez des organismes très éloignés sur le plan phylogénétique. Cet aspect peut toutefois constituer un inconvénient, puisque l'anticorps C219 peut réagir avec des transporteurs non impliqués dans le transport de xénobiotiques (Kartner *et al.*, 1985 ; Georges *et al.*, 1990), avec les Pggs sœurs (Childs *et al.*, 1995) ainsi qu'avec la myosine (Terao *et al.*, 1996). L'utilisation de témoins positifs et négatifs est donc primordiale pour s'assurer de la validité des résultats obtenus en utilisant cet anticorps. Le témoin positif le plus couramment utilisé est constitué de vésicules membranaires préparées à partir de cortex de surrénales de bovins mâles, qui a été démontré comme étant un tissu riche en Pggs (Bradley *et al.*, 1990). Des préparations de rein humain (Kurelec *et al.*, 1992) ainsi que des lignées cellulaires mammaliennes surexprimant les Pggs (Cornwall *et al.*, 1995 ; Galgani *et al.*, 1996 ; Tutundjian *et al.*, 2002a) ont également été utilisées comme témoin positif. Les témoins négatifs sont très peu employés. A notre connaissance, la seule étude présentant ce type de témoin est celle réalisée par Galgani *et al.* en 1996. Ces auteurs ont utilisé des œufs d'oursin *Strongylocentrotus purpuratus* ; les travaux de Toomey et Epel (1993) ont en effet montré que les œufs de cet organisme ne présentaient pas d'activité de transport de type MDMX.

L'utilisation d'anticorps anti-Pgp a été principalement exploitée par l'intermédiaire de Western blot. Cette technique a été utilisée pour mettre en évidence la présence du MDMX

chez divers bivalves (Tableau IV). En complément, Galgani *et al.* (1996) ont mis au point une technique dite de « dot blot » qui permet d'estimer la quantité de protéines détectées en mesurant la densité optique des spots obtenus. La gamme standard reliant la densité optique à la quantité de Pgps-like a été construite à partir des spots obtenus pour différentes quantités de protéines issues des branchies de *Mytilus galloprovincialis*. L'intérêt de cette méthode réside dans la possibilité de discriminer plusieurs échantillons en fonction de la quantité de Pgps-like détectées et éventuellement de relier cette mesure à la pollution des sites de provenance des organismes (Galgani *et al.*, 1996).

On peut regretter qu'à ce jour, les techniques d'immunohistochimie n'aient jamais été mises en œuvre chez les bivalves car leur application a permis d'étudier de manière efficace la localisation de Pgps-like dans les tissus d'autres espèces tels que le foie chez les poissons (Kleinow *et al.*, 2000 ; Albertus et Laine, 2001 ; Sturm *et al.*, 2001 ; Bard *et al.*, 2002a, b) et l'hépatopancréas chez le crabe *Carcinus maenas*, ainsi qu'au niveau des membranes cellulaires chez les éponges *Geodia cydonium* et *Verongia aerophorba* (Kurelec *et al.*, 1992).

## 2 – Méthodes directes

### 2.1 – Mesure de l'accumulation d'un substrat

La méthode d'accumulation revient à évaluer la quantité de substrat non pris en charge par le MDMX et, par conséquent, la quantité de substrat piégé à l'intérieur des cellules. Cette méthode est couramment utilisée chez les bivalves et a été adaptée par différents auteurs à l'évaluation de l'accumulation dans des tissus (Kurelec et Pivcevic, 1991) ou des cellules isolées (Cornwall *et al.*, 1995 ; Minier et Moore, 1996). Elle consiste à exposer les tissus ou les cellules isolées à un substrat qui peut être soit radioactif ( $^{14}\text{C}$ -Acétylaminofluorène ;  $^3\text{H}$ -Vincristine ;  $^3\text{H}$ -Daunomycine) soit fluorescent (Rhodamine B, 123, Calcein acétoxyméthyl ester), puis à visualiser l'accumulation du substrat dans les cellules en référence à la mesure effectuée en présence d'un inhibiteur du MDMX (Kurelec *et al.*, 2000).

## 2.2 – Mesure de l'efflux d'un substrat

La méthode d'efflux consiste à évaluer la quantité de substrat pris en charge par les MDMX et libéré dans le milieu extérieur. Initialement développée pour mesurer l'activité d'efflux sur des tissus ou des cellules isolées (Cornwall *et al.*, 1995), cette méthode a été adaptée pour l'utilisation chez des organismes vivants (*Mytilus galloprovincialis*, Smital et Kurelec, 1997 ; *Dreissena polymorpha*, Smital et Kurelec, 1997, Parant et Pain, 2001). Elle consiste à exposer dans un premier temps les organismes vivants, les tissus, ou les cellules à un substrat fluorescent (Rhodamine B, 123) qui s'accumule en grande quantité dans les cellules. Après la période d'exposition, les organismes, tissus ou cellules sont lavés puis replacés dans un milieu propre. Les cellules rejettent alors le colorant qu'elles ont accumulé auparavant de manière proportionnelle à l'activité MDXM. Le phénomène peut être observé en mesurant soit l'augmentation de la fluorescence dans le milieu extérieur (Smital et Kurelec, 1997 ; Parant et Pain, 2001) soit la diminution de fluorescence dans les cellules ou les tissus étudiés (Cornwall *et al.*, 1995 ; Galgani *et al.*, 1996). L'addition d'un inhibiteur (vérapamil, cyclosporine A) dans le milieu d'exposition ou dans le milieu d'efflux permet d'inhiber l'efflux de colorant à l'une ou l'autre des étapes et ainsi, permet d'évaluer avec précision la part du rejet attribuée à l'activité MDXM (Kurelec *et al.*, 2000 ; Smital *et al.*, 2000b ; Parant et Pain, 2001).

## 2.3 – Exploitation des méthodes d'accumulation et d'efflux

Les deux méthodes précédemment décrites figurent parmi les plus utilisées parce qu'elles permettent une mesure simple et directe de l'activité en s'appuyant sur l'aspect fonctionnel. Elles sont complémentaires et permettent, lorsqu'elles sont employées conjointement, de confirmer et d'affiner les résultats obtenus (Kurelec *et al.*, 2000).

Ces méthodes peuvent être exploitées de différentes manières. L'application principale consiste à les utiliser pour évaluer l'activité MDXM chez des organismes placés en situation de stress (laboratoire ou *in situ*). La comparaison des activités mesurées permet alors d'évaluer la modulation du niveau de défense cellulaire des organismes dans le milieu où ils ont été placés (Kurelec *et al.*, 1996a, b ; Smital et Kurelec 1998b, Smital *et al.*, 2000b ; Parant et Pain, 2001).

En se basant sur le principe de l'inhibition compétitive, il est possible d'identifier des substrats potentiels du mécanisme MDMX en évaluant l'effet d'un composé donné sur la cinétique d'accumulation ou d'efflux d'un substrat traceur (Kurelec *et al.*, 2000). Le principe d'inhibition compétitive est également utilisé pour mesurer l'effet d'une eau naturelle sur la cinétique d'accumulation ou d'efflux d'un substrat traceur (Kurelec *et al.*, 1995a ; Smital et Kurelec, 1997 ; Kurelec *et al.*, 2000). La comparaison des résultats obtenus en présence ou en absence de l'eau à tester permet d'évaluer l'intensité d'interaction des composés présents dans l'eau avec le mécanisme MDXM. Plus l'interaction est importante, plus les composés présents dans l'eau sont susceptibles d'amener les organismes à une situation de défense cellulaire extrême. La composition du milieu testé représente donc un potentiel toxique pour la cellule et il est à surveiller avec la plus grande attention (Kurelec, 1997 ; Smital et Kurelec, 1998a).

Même si aucun exemple n'est à l'heure actuelle disponible dans la littérature, il est envisageable d'appliquer ce même principe pour détecter la présence de composés substrats du MDMX dans un mélange de xénobiotiques.

## **D – Comportement de l'activité MDMX**

### **1 – Activité constitutive**

L'hypothèse selon laquelle l'activité MDMX puisse exister de manière constitutive chez toutes les espèces a été suggérée suite à l'observation de la présence et/ou d'un niveau d'activité mesurable, même chez des organismes vivant sur des sites de bonne qualité et n'ayant jamais été confrontés à de fortes pollutions de leur milieu (Kurelec, 1992 ; Kurelec, 1995a). Le niveau de cette activité constitutive s'est avéré variable au sein d'une même espèce en fonction de la qualité des sites d'origine des populations étudiées. Ainsi, les organismes provenant des sites les plus contaminés présentent un niveau d'activité MDMX ou d'expression des Pgps-like significativement plus élevé que celui mesuré chez les organismes prélevés sur les sites non contaminés (Minier *et al.*, 1993 ; Kurelec et Pivcevic, 1991 ; Kurelec, 1995b ; Kurelec *et al.*, 1996a ; Smital et Kurelec, 1998b). Les résultats d'une étude comparant les niveaux d'activité dépurée (niveau basal) chez six espèces de mollusques (bivalves et gastéropodes marins ou dulçaquicoles) ont montré que l'activité mesurée présentait les mêmes caractéristiques chez toutes ces espèces, mais les plus

tolérantes, vivant sur des sites fortement contaminés, présentaient des niveaux d'activité plus élevés que ceux mesurés chez les plus sensibles, vivant dans des milieux de bonne qualité (Smital *et al.*, 2000b).

Ces exemples montrent que le niveau constitutif de l'activité MDMX peut être différent d'une population à l'autre (échelle intraspécifique) et d'une espèce à l'autre (échelle interspécifique). En effet, toutes les populations ou espèces n'ont pas les mêmes besoins de protection, puisqu'elles ne sont exposées ni aux mêmes stress, ni aux mêmes niveaux de stress en fonction de la qualité de leur milieu.

Les populations naturelles semblent inégalement armées contre la pollution des écosystèmes aquatiques. En ce sens, la mesure de l'activité MDMX constitutive pourrait constituer un biomarqueur de susceptibilité des populations naturelles (Smital et Kurelec, 1998a). En effet, les niveaux présentés par les organismes pourraient être interprétés en terme de niveau de protection ou d'efficacité de défense et donc en terme de tolérance aux milieux de qualité médiocre.

La variabilité du niveau constitutif mesuré dans les populations naturelles pose également la question des capacités de réaction et d'induction du MDMX. Si les niveaux d'activité basale au sein de différentes populations sont variables, les capacités d'induction et donc les niveaux de protection le sont probablement aussi.

## 2 – Induction du MDMX

L'induction du MDMX chez les bivalves a été mise en évidence suite à l'exposition à des molécules substrats ou à des milieux contaminés et ce, quelques soient les modèles d'études utilisés (cellules, tissus, organismes vivants...), les méthodes de mesure mises en œuvre ou les conditions expérimentales (*in situ* ou en laboratoire).

L'induction du MDMX se traduit généralement par une augmentation de l'activité d'efflux des substrats et/ou par une augmentation de la quantité de Pgps-like. La littérature présente des exemples de travaux ayant mesuré l'amplitude de l'induction chez des organismes exposés à une contamination naturelle (*in situ*) ou artificielle (laboratoire) par rapport aux témoins non exposés. Les exemples présentés dans le tableau VI mettent en

**Tableau VI :** Induction du MDMX chez différentes espèces de bivalves après exposition à des composés substrats en laboratoire (PCP, pentachlorophénol ; DDE, 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophényl)-éthylène ; CdCl<sub>2</sub>, chlorure de cadmium ; NaAsO<sub>3</sub>, arsénite de sodium) ou à une contamination naturelle in situ. L'induction du MDMX est estimée par la mesure de l'augmentation du titre protéique ou par la réduction de l'accumulation cellulaire de composés traceurs. Les amplitudes d'induction sont présentées relativement au résultat obtenu dans le témoin. Lorsque les données chiffrées ne sont pas disponibles, la mise en évidence d'une induction significative est signalée par le symbole +.

Paramètres mesurés	Organismes		Exposition	Durée de l'exposition (jours)	Résultats par rapport au témoin	Références
Augmentation du Titre Protéique	Marins	<i>Mytilus edulis</i>	Vincristine	19 à 29	x 1,5 à 2,5	Minier et Moore, 1996
		<i>Mytilus californianus</i>	Chlorthal / Arochlor 1254 (5ppm)	3	+	Eufemia et Epel, 1998
			Chlorthal / PCP / DDE (1 / 5ppm)	1 à 3	+	Eufemia et Epel, 2000
			CdCl <sub>2</sub> (500ppb) / NaAsO <sub>3</sub> (1 / 5 ppm)	1 à 3	+	
		<i>Crassostrea gigas</i>	12 Sites contaminés	30	+(1 site)	Ringwood <i>et al.</i> , 1999
Réduction de l' Accumulation	Marins	<i>Mytilus edulis</i>	Vincristine (5 / 10µg/mL)	19 à 29	35 / 48%	Minier et Moore, 1996
		<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Site contaminé	3	62%	Kurelec, 1995
			Rhodamine 123 / Diesel-2-oil	4	45 à 50%	Smital et Kurelec, 1998
		<i>Mytilus californianus</i>	Chlorthal / Arochlor 1254 (5ppm)	3	>75% / 50%	Eufemia et Epel, 1998
			Chlorthal / PCP / DDE (1 / 5ppm)	1 à 3	>50%	Eufemia et Epel, 2000
			CdCl <sub>2</sub> (500ppb) / NaAsO <sub>3</sub> (1 / 5 ppm)	1 à 3	50% / 40 à 80%	
	Dulçaquicoles	<i>Corbicula fluminea</i>	Diesel-2-oil	3	43%	Kurelec <i>et al.</i> , 1996
			Eau + Sédiments du Rhin	3	28%	

évidence la difficulté de résumer l'ensemble des données parce que d'une part les résultats sont obtenus par la mesure de différents paramètres et d'autre part, les résultats obtenus pour un même paramètre sont très variables du fait de la diversité des organismes utilisés et des conditions d'exposition. Toutefois, il semble que les capacités d'induction soient relativement variables.

La réaction d'induction prend généralement place rapidement. En effet, des niveaux induits d'activité MDMX ont pu être observés après 3 à 4 jours d'exposition (Kurelec *et al.*, 1995b, 1996b ; Smital et Kurelec, 1998b). Cependant, dans ces exemples, des temps d'exposition plus longs n'ont pas été testés et il serait probablement intéressant d'étudier l'évolution de la réaction à plus long terme afin de déterminer si cette réaction se maintient dans le temps.

Une autre caractéristique du processus d'induction de l'activité MDMX a été mise en évidence par les travaux de Kurelec (1995b), qui ont en effet montré que l'état induit était corrélé à une diminution de la sensibilité à un inhibiteur, le vérapamil. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait qu'à l'état induit, le MDMX limite l'entrée de l'inhibiteur dans la cellule et /ou le rejette activement, ne lui permettant plus de remplir son rôle.

L'ensemble des travaux cités précédemment met en évidence l'inductibilité du MDMX suite à une exposition à une charge organique anormalement élevée. L'induction mesurée refléterait alors la nécessité pour les organismes d'accroître leurs capacités de défense face à un environnement agressif et en ce sens, refléterait le niveau d'exposition de ces organismes. L'induction mesurée pourrait alors être considérée comme le reflet du degré de contamination des sites étudiés. Des travaux ont appuyé cette hypothèse en montrant l'existence d'une corrélation entre la quantité de protéines ou l'activité MDMX et le niveau de contamination organique des sites d'origine des bivalves étudiés (Minier *et al.*, 1993 ; Kurelec *et al.*, 1996a).

Cependant, cette corrélation ne semble pas systématique. Ainsi les niveaux d'expression des Pgps-like dans les branchies de bivalves marins n'étaient corrélés ni au degré de pollution des sites d'origine (*Crassostrea virginica* ; Keppler et Ringwood, 2001b), ni aux taux de contaminants environnementaux accumulés dans les tissus des organismes (*Mytilus sp.* ; Minier *et al.*, 2000). Dans une autre étude, le niveau d'expression des Pgps-like chez



*Mytilus galloprovincialis* était corrélé au degré de pollution excepté dans le cas du site le plus contaminé (Kurelec *et al.*, 1996a). D'autres auteurs ont décrit une situation similaire, c'est à dire une induction particulièrement faible, voire même absente, chez des organismes provenant de sites fortement contaminés ou chez des organismes exposés à de fortes doses de polluants (Bresler *et al.*, 1999). En laboratoire, l'exposition de bivalves marins à différents contaminants a permis de montrer une activité et une expression des Pgps-like plus prononcées dans les doses d'exposition les plus fortes (Minier et Moore, 1996 ; Eufemia et Epel, 2000). Cependant quelques exemples pris chez les poissons font état d'une absence de corrélation entre l'induction de l'activité ou du titre protéique et les doses de xénobiotiques appliquées (Doi *et al.*, 2001 ; Sturm *et al.*, 2001). Ce type de résultat, à savoir une absence ou une réduction de l'induction dans le cas d'une exposition forte à des composés substrats, peut s'expliquer soit par l'apparition d'un effet toxique, soit par un phénomène de saturation ou d'inhibition du MDMX.

### 3 – Saturation / inhibition du MDMX

Le MDMX possède une capacité intrinsèque à gérer une charge organique environnementale. Il possède également une capacité d'induction lorsque la charge organique augmente. Mais lorsque cette charge devient trop importante, les composés organiques s'accumulent au sein des cellules et le système est saturé. La saturation du mécanisme entraîne l'inhibition de l'efflux des substances toxiques susceptibles d'être également présentes dans la cellule. La sensibilité de la cellule aux polluants environnementaux peut ainsi être accentuée et la survenue d'un effet toxique est alors envisageable. Ces substances, capables d'induire une hypersensibilité aux xénobiotiques toxiques en neutralisant le MDMX, ont été appelées « chimiosensibilisants » (« chemosensitizers », Kurelec, 1992). Quelques travaux ont souligné l'importance à accorder à ces composés (Kurelec, 1995a, 1997 ; Smital et Kurelec, 1998 ; Britvic et Kurelec, 1999). Il a en effet été démontré que l'addition de composés inhibiteurs du MDMX générait l'apparition d'effets génotoxiques chez des corbicules (*Corbicula fluminea*) exposées au 2-aminoanthracène ou au 2-acétylaminofluorène à des doses inférieures à la concentration sans effet (Waldmann *et al.*, 1995 ; Kurelec *et al.*, 1996b). De la même manière, la présence de chimiosensibilisants a entraîné l'augmentation de la fréquence d'apparition de malformations chez des embryons d'invertébrés exposés à des

composés toxiques (Toomey et Epel, 1993, McFadzen *et al.*, 2000). Ces exemples démontrent clairement l'impact que peuvent exercer les chimiosensibilisants : des inhibiteurs naturels du MDMX sont capables de transformer la concentration sans effet de produits toxiques (NOEC, No Observed Effect Concentration) en concentration provoquant un effet (OEC, Observed Effect Concentration). L'interprétation de tels résultats en terme de risque écotoxicologique laisse entrevoir la possibilité que des contaminants environnementaux à des concentrations inférieures aux normes de toxicité établies puissent exercer leurs effets toxiques sur les organismes, si le système de défense MDMX est débordé. Devant l'importance qu'ils prennent dans l'évaluation du risque écotoxicologique, des méthodes de quantification de ces composés dans les milieux naturels ont été développées (ce chapitre, § III-C-2.3 ; Kurelec *et al.*, 2000).

#### 4 – Variations physiologiques saisonnières

Toutes les activités biologiques subissent des variations physiologiques saisonnières liées à des facteurs abiotiques tels que la température du milieu ou à des facteurs biotiques tels que la nutrition ou le cycle reproducteur. Les niveaux de pollution subissent également l'influence des variations saisonnières liées aux conditions climatiques (pluviométrie, température...), mais également aux cycles d'activité industrielle (Sheehan et Power, 1999). Il convient d'étudier et de comprendre l'ensemble de ces variations et les réactions qu'elles provoquent sur les activités biologiques, et plus particulièrement sur les activités biomarqueurs. Il est en effet primordial de cerner ces variations naturelles afin de distinguer l'effet des contaminants dans la réponse obtenue.

Des suivis annuels de l'activité MDMX chez des bivalves marins (*Mytilus galloprovincialis*, Minier *et al.*, 1999 ; *Crassostrea virginica*, Keppler et Ringwood, 2001a, b) ont permis la mise en évidence d'un cycle saisonnier de cette activité. Les niveaux sont plus élevés en été et en automne. Cette induction de l'activité ne pouvait en aucun cas être reliée à l'apparition de pollution (Bard, 2000 ; Minier *et al.*, 2000). En revanche, elle coïncidait avec l'augmentation de la température de l'eau et le développement de blooms algaux, mais également avec une induction des protéines de chocs thermiques (Heat Shock Protein). Ces hypothèses émises à partir d'observations *in situ* ont été confirmées par des travaux en laboratoire montrant l'induction du MDMX chez des moules marines (*Mytilus*

*californianus*) exposées à des chocs thermiques (Eufemia et Epel, 1998, 2000). Des travaux ont également mis en évidence l'action modulatrice d'extraits d'algues sur le transport MDMX (Eufemia *et al.*, 2002).

## 5 – Comparaison de la réaction du MDMX avec celles de biomarqueurs

Parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement, les biomarqueurs sont utilisés afin d'estimer l'impact des polluants sur les organismes (Lagadic *et al.*, 1997a). Si le MDMX présente quelques atouts intéressants pour incarner un biomarqueur chez les bivalves, il reste encore à comparer sa réaction avec celle de fonctions biologiques dont les modifications face à la contamination sont couramment utilisées en tant que biomarqueurs.

### 5.1 – Comparaison avec la réaction de biomarqueurs d'exposition

#### 5.1.1 – Métabolisme des xénobiotiques

En ce qui concerne la comparaison entre la réponse du MDMX et celle des systèmes de phase I, les données disponibles chez les bivalves sont très limitées. Il semblerait cependant que les inducteurs de ces systèmes, ou tout au moins certains d'entre eux, puissent également être substrats du MDMX. Il faut souligner cependant que cette hypothèse a été émise à partir de comparaisons de la réaction des deux systèmes chez des organismes différents (bivalves et poissons) exposés aux mêmes conditions (Kurelec *et al.*, 1996a).

En ce qui concerne les systèmes de Phase II, quelques données sont disponibles chez les bivalves. Une activité GST (Glutathion-S-Transferase) particulièrement élevée a en effet été mesurée dans les tissus présentant une forte activité MDMX (*Anodonta cygnea*, Kurelec et Pivcevic, 1989 ; *Mytilus galloprovincialis*, Kurelec et Pivcevic, 1991). Au cours d'une étude multimarqueurs sur plusieurs espèces de bivalves et gastéropodes marins, Bresler *et al.* (1999) ont également observé une relation entre la présence du MDMX et une forte activité GST, particulièrement sur les sites les plus contaminés.

### 5.1.2 – Exposition à un stress général

La réponse du MDMX a également été confrontée à celle de biomarqueurs de stress général, comme les protéines de choc thermique (Heat Shock Protein, HSP) et la fragilité lysosomale.

La synthèse accrue de protéines HSP a initialement été mise en évidence suite à l'exposition à un stress thermique (Tissières *et al.*, 1974). Ces protéines ont en effet un rôle dans l'adaptation des organismes aux températures extrêmes et aux variations saisonnières de la température de leur milieu, mais elles interviennent également en réponse à l'exposition à différents stress, parmi lesquels figure l'exposition aux xénobiotiques. Le suivi annuel de l'expression des Pgps-like et HSP chez *Mytilus galloprovincialis* a montré l'existence d'un cycle saisonnier (Minier *et al.*, 2000). Les expressions des deux protéines étaient corrélées entre elles et à la température de l'eau. Des travaux en laboratoire ont montré que l'exposition de *Mytilus californianus* à des chocs thermiques ou à des xénobiotiques environnementaux entraînait l'induction à la fois du MDMX et des HSP (Eufemia et Epel, 2000). En revanche, aucune corrélation significative n'a pu être mise en évidence entre l'expression des Pgps-like et HSP mesurée chez des huîtres (*Crassostrea gigas*) et le gradient de pollution auquel elles ont été exposées (Ringwood *et al.*, 1999). Ces quelques exemples tendent à montrer que le MDMX réagit d'une manière similaire à celle des HSP et confortent ainsi les hypothèses selon lesquelles il pourrait également être considéré comme un marqueur généraliste, mettant en évidence l'exposition à un stress environnemental global.

Les lysosomes sont des organites cellulaires impliqués dans des processus physiologiques normaux (digestion intracellulaire, séquestration de composés intra- et extracellulaire...) et dans des processus de détoxification en dégradant et/ou stockant les micropolluants organiques et métalliques. Les systèmes lysosomaux peuvent être déstabilisés par un excès de pollution, mais également par un certain nombre de facteurs biotiques (reproduction) et abiotiques (hypoxie, salinité, température). La stabilité lysosomale est un paramètre utilisé comme marqueur de stress général (Pellerin-Massicotte et Tremblay, 1998). La présence de Pgps-like a de surcroît été montrée dans les membranes lysosomales des hémocytes chez la moule *Mytilus sp.* (Minier et Moore, 1996) et chez le crabe *Carcinus maenas* (Köhler *et al.*, 1998b), ce qui justifie la comparaison et la possible

adéquation des réponses de ces deux systèmes. Ringwood *et al.* (1999) ont montré l'existence d'une corrélation significative entre la déstabilisation lysosomale et l'exposition à la pollution chez *Crassostrea virginica*, alors qu'aucune corrélation n'a pu être établie en ce qui concerne le MDMX. A l'inverse, l'étude de Bresler *et al.* (1999) montre que la réponse du MDMX était corrélée à celle des lysosomes, ces deux marqueurs réagissant de manière plus marquée sur les sites pollués.

## 5.2 – Comparaison avec la réaction de biomarqueurs d'effet

Quelques études ont mis en évidence une corrélation entre la réaction du MDMX et celles de biomarqueurs d'effets. L'inhibition du MDMX chez des organismes exposés au 2-acétylaminoanthracène entraîne l'apparition d'effets génotoxiques, en l'occurrence de cassures simple brin de l'ADN (Kurelec, 1995a). Une corrélation négative a été mise en évidence entre l'apparition de micronoyaux et l'activité MDMX (Bresler *et al.*, 1999). En effet, une activité MDMX induite assure une protection des cellules et limite l'exposition aux xénobiotiques, et en conséquence, l'apparition des effets. Au contraire, l'inhibition du système de défense favorise l'accumulation des xénobiotiques et à terme, la survenue des effets.

D'autres travaux ont étudié des biomarqueurs d'effets en parallèle à l'activité MDMX, comme par exemple, la lipéroxidation lipidique, marqueur de stress oxydant (Ringwood *et al.*, 1999) et l'inhibition de l'activité acétylcholinestérase, marqueur d'effet neurotoxique par les organophosphorés et carbamates (Bresler *et al.*, 1999 ; Minier *et al.*, 2000). Mais jusqu'à présent, aucune corrélation significative n'a pu être établie de manière certaine.

## E – Le MDMX : un biomarqueur ?

### 1 – Bilan

Les propriétés du MDMX et sa place au sein de la défense cellulaire en font un mécanisme de défense de première ligne, protégeant les organismes contre l'entrée et l'accumulation des xénobiotiques dans les cellules et limitant ainsi leurs éventuels effets toxiques. L'ensemble des travaux effectués à tous les niveaux d'organisation animale

montre une absence de spécificité à un type particulier de contaminant. Le MDMX réagit plutôt face à un cumul de composés organiques substrats.

L'analogie avec le système MDR chez les mammifères a permis la transposition de nombreuses données biochimiques au MDMX dans les populations naturelles. Chez les mollusques bivalves, des Pgps-like, des substrats et des modulateurs de l'activité MDMX ont ainsi été identifiés. Des méthodes de mesure ont également été développées, permettant l'évaluation de la présence et du niveau d'activité MDMX au niveau des organismes entiers, des tissus ou des cellules. Ces protocoles peuvent être mis en œuvre soit pour mesurer l'induction du mécanisme chez des organismes exposés à des stress environnementaux, soit pour évaluer le potentiel substrat et/ou modulateur de certains composés, mélanges ou eaux naturelles.

Le comportement de l'activité MDMX chez les bivalves semble se caractériser d'une part par un niveau constitutif présent chez quasiment tous les organismes étudiés, et d'autre part par une capacité d'induction du mécanisme de défense face à l'apparition d'un stress et notamment face à l'apparition d'une charge organique polluante. L'activité MDMX réagit rapidement et de manière non spécifique aux modifications de l'environnement. La contamination organique globale apparaît comme la principale source de modulation de l'activité MDMX. Toutefois, des travaux ont montré que d'autres facteurs pouvaient intervenir pour moduler la réponse. Ainsi, l'activité MDMX est sensible à la présence de composés chimiosensibilisants et semble soumise à des variations saisonnières.

La comparaison de la réaction du MDMX avec celle d'autres activités utilisées comme biomarqueur semble confirmer deux points :

- Le MDMX est un système de défense cellulaire précoce, situé en amont des autres systèmes identifiés aujourd'hui. En effet, son action se situe dès l'entrée des xénobiotiques dans la membrane cellulaire. Sa précocité et son inductibilité en présence de pollution lui confèrent des qualités indispensables pour constituer un biomarqueur d'exposition (Kurelec, 1992 ; Epel, 1998 ; Minier *et al.*, 1999).
- L'activation du MDMX répond à l'apparition d'un stress global. Il a été montré que le MDMX transportait de grandes variétés de composés organiques et que ces composés

étaient capables d'induire le système de défense. Cependant, le système peut être induit de manière non spécifique par des composés non substrats ou par des chocs thermiques. De plus les études comparant la réponse du MDMX avec celles d'autres biomarqueurs montrent que le MDMX présente un pattern d'induction proche de ceux des biomarqueurs généralistes comme les protéines HSP et la fragilité lysosomale (Bard, 2000 ; Eufemia et Epel, 2000).

## **2 – Etude de l'activité MDMX chez *Dreissena polymorpha***

Au vu de l'ensemble des résultats actuellement publiés, il semble que le MDMX présente un réel potentiel pour constituer un nouvel outil de surveillance de la qualité des écosystèmes aquatiques et un nouvel outil d'évaluation du risque environnemental pour les populations naturelles.

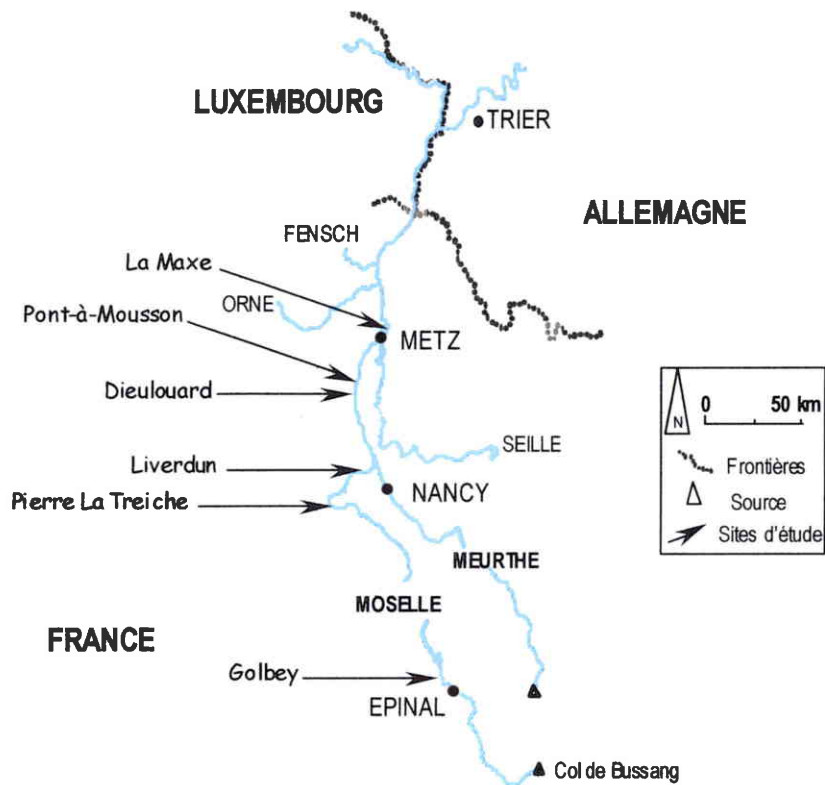
Dans ce contexte, ce travail de thèse s'est attaché à mettre en évidence l'existence d'une activité MDMX chez la dreissène dans la rivière Moselle et à développer la méthode d'efflux comme méthode d'évaluation de l'activité MDMX chez cet organisme. L'ensemble des travaux s'est ensuite orienté vers l'étude du comportement de l'activité face à différentes conditions de contaminations théoriques en laboratoire et de contaminations naturelles *in situ*. L'objectif de ce travail consistait à comprendre la réaction de ce biomarqueur potentiel avant d'envisager son utilisation possible dans le cadre du suivi de la qualité des milieux aquatiques.

## CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES

CHAPITRE 2.1 : MATERIELS

CHAPITRE 2.2 : METHODES





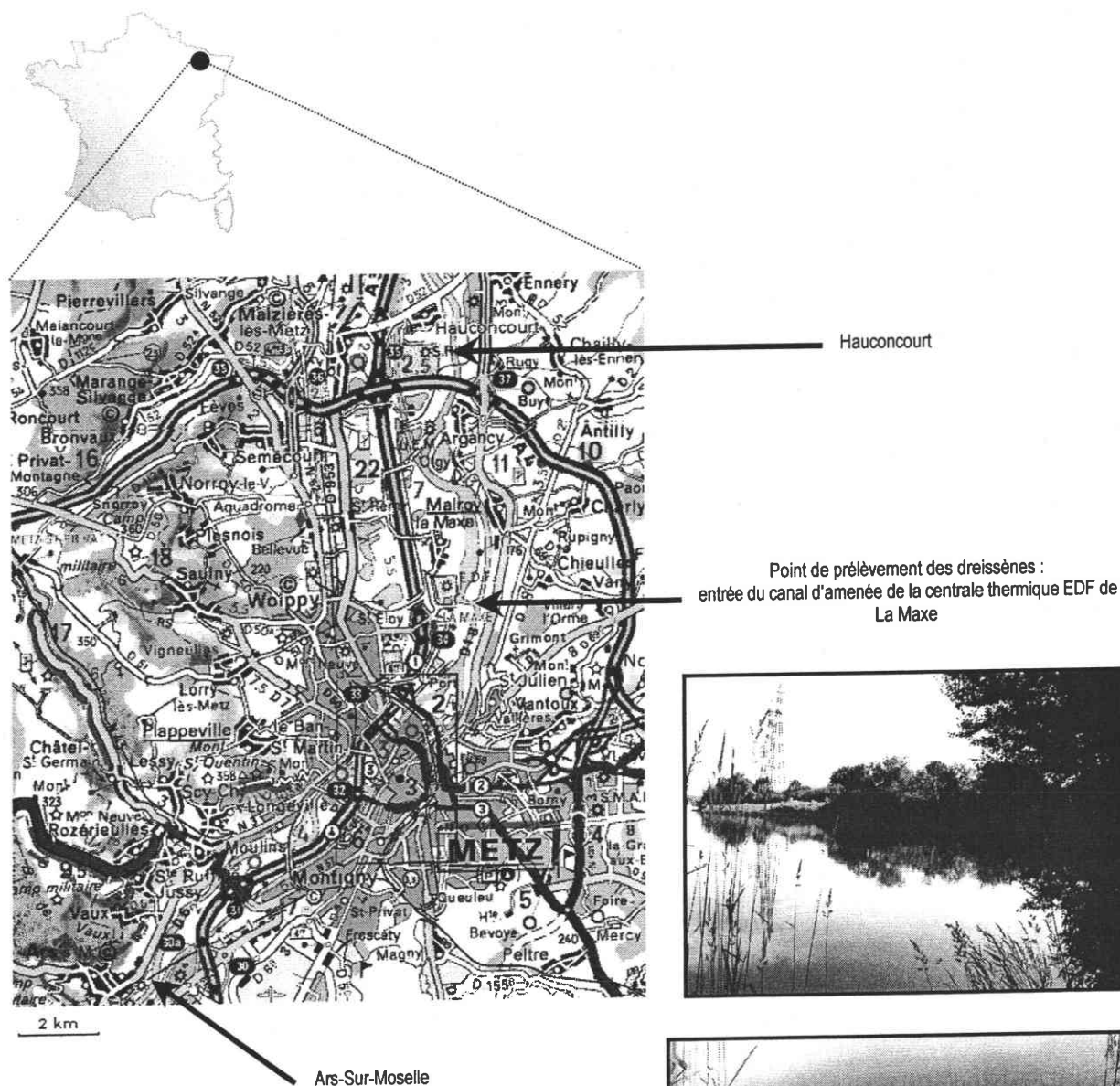
**Figure 3 :** Carte du cours français de la Moselle de sa source au Col de Bussang jusqu'aux frontières luxembourgeoise et allemande. Les principaux affluents, ainsi que les sites ayant fait l'objet d'études au cours de nos travaux, sont représentés (modifié d'après Bachmann et al., 1997).

## Chapitre 2.1 : Matériels

### I – Présentation de la Rivière Moselle

La Moselle prend sa source au col de Bussang sur le versant ouest du massif des Vosges et se dirige vers le nord-ouest, en passant par Epinal et Toul. En amont d'Epinal, la Moselle reçoit en rive droite la Moselotte et la Vologne. Le Madon rejoint la Moselle en rive gauche en amont de Toul. Au nord de Nancy, la Moselle reçoit la Meurthe en rive droite et poursuit ensuite son parcours en passant par Metz et Thionville, en direction du nord jusqu'à la frontière franco-germano-luxembourgeoise. Dans la traversée de Metz, la Moselle reçoit en rive droite la Seille puis en rive gauche, en amont de Thionville, l'Orne et la Fensch. Après un parcours d'environ 520 km, la Moselle se jette dans le Rhin à Coblenze (Figure 3) (*Commission Internationale pour la Protection de la Moselle et de la Sarre, CIPMS* – <http://www.iksms-cipms.org/>).

La confluence avec la Meurthe en aval de Nancy entraîne des modifications considérables des caractéristiques physico-chimiques, notamment au niveau de la minéralisation de l'eau. L'importance de ces modifications permet de distinguer la Moselle amont de la Moselle aval au point de cette confluence. Dans sa partie aval, la Moselle fait partie des grandes rivières régulées où l'activité fluviale a entraîné un aménagement conséquent du cours, et donc une artificialisation importante du milieu physique (Bachmann *et al.*, 1997).



*Figure 4 : Localisation géographique et photographies du site de La Maxe, au niveau de la jonction entre la Moselle et le canal d'amenée de la centrale thermique EDF.*

## II – Site de prélèvement des dreissènes : La Maxe

### A – Situation géographique et description

L'ensemble des dreissènes utilisées au cours de cette étude a été prélevé dans la Moselle aval, à environ trois kilomètres en aval de l'agglomération messine. Le site de prélèvement se situe sur la commune de La Maxe (49°10N, 6°12E, altitude 183 m) à la jonction entre la Moselle et le canal d'amenée d'une centrale thermique EDF (Figure 4). Au niveau de cette jonction, les berges, facilement accessibles, sont essentiellement constituées de pierres et de blocs (Classification des substrats minéraux, *in* Tachet *et al.*, 2000) représentant un substrat particulièrement apprécié des dreissènes qui s'y fixent aisément à l'aide de leur byssus.

### B – Qualité physico-chimique

Le bassin versant de la Moselle est constamment suivi du point de vue de la qualité de l'eau par la Banque de l'eau Rhin-Meuse (BERM) dans le cadre de la surveillance des cours d'eau français au moyen du Réseau National de Bassin initié par le ministère chargé de l'Environnement en 1971. Etant donné que le site de la Maxe ne fait pas partie des points régulièrement contrôlés, nous nous basons sur les analyses réalisées à Ars-Sur-Moselle (15 km en amont de La Maxe ; 49°4N, 6°4E, altitude 179 m) et à Hauconcourt (6 km en aval de La Maxe ; 49°13N, 6°10E, altitude 174 m) (Figure 4). Afin de caractériser la qualité physico-chimique de la Moselle entre ces sites, nous nous sommes basés sur les données acquises par la BERM (<http://www.eau-rhin-meuse.fr/BERM/HTM/default.htm>.) pour les années 1998 à 2001 (les données 2002 sont en cours d'acquisition et ne sont pas disponibles pour le moment). La qualité physico-chimique est sensiblement la même en amont et en aval de Metz, malgré une légère dégradation entre Ars-Sur-Moselle (classe 1B à 2)\* et Hauconcourt (classe 2)\*, qui s'explique par la traversée de l'agglomération messine. En effet, outre les divers rejets urbains et industriels, la Moselle reçoit à ce niveau, les eaux d'une rivière fortement minéralisée (la Seille). Cependant le profil des perturbations

\* Les seuils et classes de qualité établis par le Réseau National de Bassin sont référencés en annexe 1.

détectées reste similaire. L'ensemble des données physico-chimiques concernant ces deux sites sont présentées en annexe 2. L'analyse est gérée par type d'altération selon l'outil de diagnostic de la qualité des eaux actuellement en cours, le SEQ-Eau (Système d'Evaluation de la Qualité des Eaux). Il est à souligner qu'aucune donnée concernant la présence de micropolluants organiques et minéraux n'est disponible pour ces sites.

L'altération « matières organiques et oxydables » mesure l'impact des rejets urbains, agricoles et industriels de matières organiques sur le milieu récepteur (désoxygénation de l'eau, libération de substances telles que l'ammonium ou les nitrites, envasement du fond des cours d'eau et développement de germes susceptibles d'être pathogènes). Concernant cette altération, la qualité est globalement médiocre dans la partie aval du bassin de la Moselle et notamment au niveau de l'agglomération messine, aussi bien en amont qu'en aval.

Les altérations « matières azotées » et « nitrates » rendent compte de la perturbation du cycle de l'azote par les apports anthropiques ; la qualité des sites étudiés en Moselle concernant ces paramètres est globalement médiocre, notamment pour les nitrites et les nitrates qui peuvent respectivement atteindre des valeurs proches de 1 et 20 mg/L.

L'altération « matières phosphorées » traduit les perturbations du cycle du phosphore. La pollution liée au phosphore est globalement importante sur tout le bassin Rhin-Meuse et n'épargne pas la Moselle à Metz où de fortes concentrations en phosphore (jusqu'à 1 mg/L) sont régulièrement mesurées.

L'altération « minéralisation » recense les niveaux de plusieurs ions dans les cours d'eau comme les chlorures, les sulfates, le calcium, le magnésium, le potassium et les carbonates. La conductivité est globalement assez élevée sur les sites étudiés autour de Metz (1500  $\mu\text{S}/\text{cm}$  en moyenne). Quelques perturbations ponctuelles sont à noter pour les sulfates et le calcium, mais la perturbation principale concerne le paramètre « chlorures » qui est problématique dans les eaux lorraines. Leur présence importante est liée d'une part au substrat géologique et d'autre part aux activités industrielles. Ainsi, la Moselle voit sa concentration en chlorures augmenter à partir de sa confluence avec la Meurthe qui draine des rejets industriels chargés en ces ions. Comme nous l'avons déjà signalé, la Seille amène

une minéralisation supplémentaire au niveau de Metz, où l'on peut ainsi relever des concentrations en chlorures allant jusqu'à 650 mg/L.

L'altération « micro-organismes » rend compte de la qualité bactériologique des eaux. La plupart des micro-organismes sont présents de manière naturelle dans les milieux aquatiques ; en revanche, une présence accrue de certaines catégories comme les streptocoques fécaux et les coliformes thermotolérants témoigne d'une contamination d'origine fécale qui alerte sur le risque de présence de germes pathogènes dans les eaux. D'un point de vue global, l'ensemble du bassin versant ne présente pas une qualité satisfaisante pour cette altération et les niveaux de micro-organismes relevés dans la Moselle à Metz pour les 4 années écoulées sont très importants. Ainsi, on relève à Metz des niveaux moyens allant de 1000 à 3000 unités/100 mL de coliformes thermotolérants et jusqu'à 900 unités/100 mL de streptocoques fécaux.

L'altération « phytoplancton » renseigne sur les proliférations végétales planctoniques favorisées par des apports importants en nutriments (azote et phosphore), la stagnation des eaux et un ensoleillement important (parfois accentué par la suppression des arbres sur les berges). Ces proliférations peuvent être nuisibles par déstabilisation de l'équilibre en oxygène et par augmentation des teneurs en matières organiques et oxydables. De plus la prolifération d'algues toxiques peut poser des problèmes sanitaires pour l'utilisation de l'eau pour les loisirs. La qualité de la Moselle à Metz au niveau de ce paramètre reste médiocre sur l'ensemble des années étudiées.

La qualité de la Moselle au niveau de Metz est globalement passable\* mais reflète la qualité relevée sur l'ensemble de sa partie aval.

### C – Répartition de la dreissène *Dreissena polymorpha* dans la Moselle

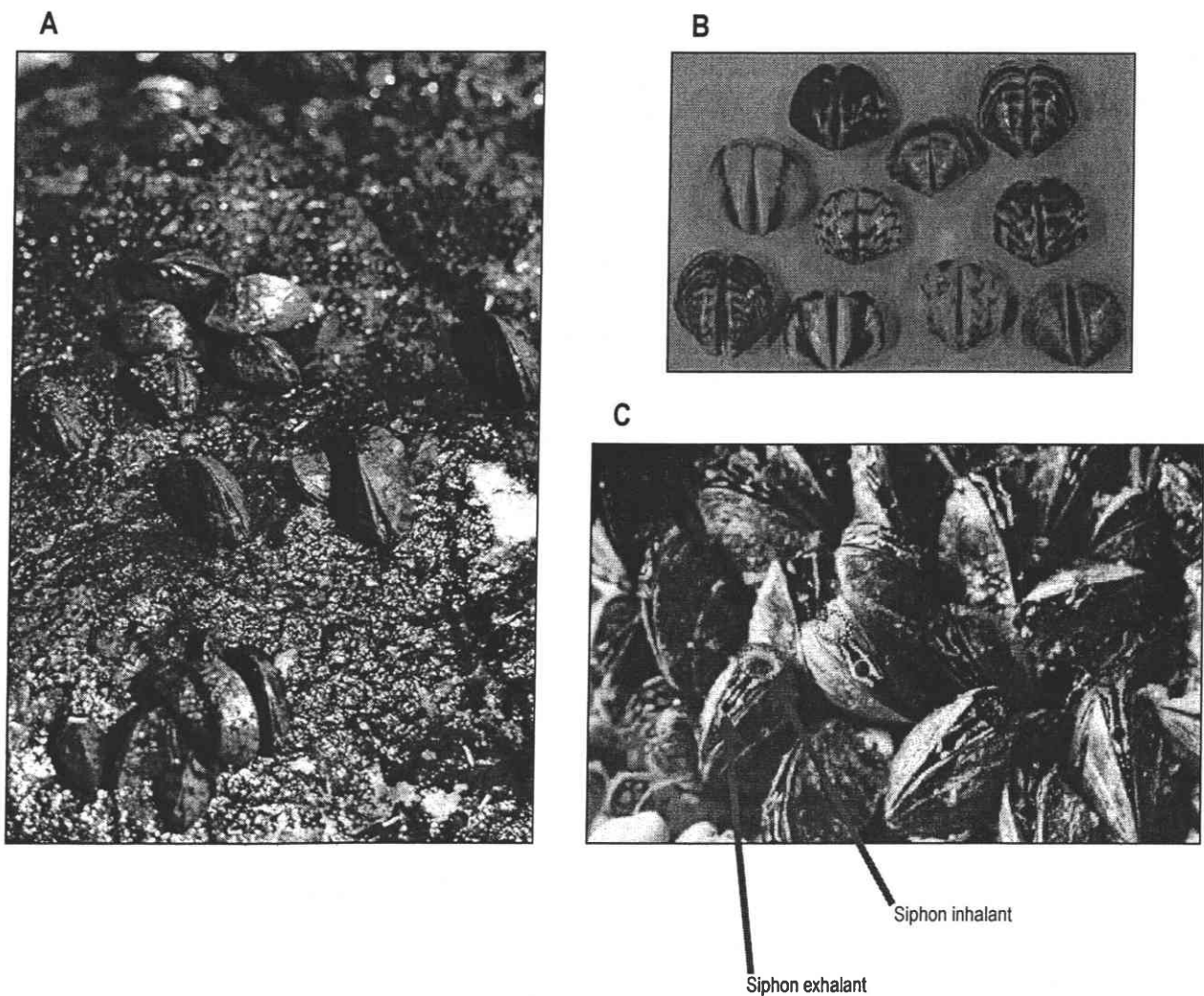
La dreissène a été référencée dès 1854 dans le canal de la Marne au Rhin près de Nancy. Quelques années plus tard on la retrouve dans la Meurthe et dans la Moselle

---

\* Les termes utilisés pour décrire la qualité de l'eau (excellente, bonne, passable et pollution excessive) sont ceux définis par le Réseau National de Bassin et correspondent aux notes de qualité attribuées par l'outil SEQ-Eau.

lorraine. Cette espèce est ensuite recensée dans la Moselle luxembourgeoise ainsi que dans la Moselle allemande au début du 20<sup>ème</sup> siècle (Dhur et Massard, 1995 ; Bachmann, 2000).

L'étude de la répartition de la dreissène dans la Moselle a montré que cette espèce est présente depuis l'amont de la confluence avec la Meurthe (Bachmann *et al.*, 1997). Dans cette zone de la Moselle amont, les densités sont relativement faibles (10 à 100 individus/m<sup>2</sup>). Malgré une qualité physico-chimique moins satisfaisante, la partie aval réunit des caractéristiques optimales pour le développement de cette espèce qui affectionne les eaux très minéralisées. Dans ce milieu favorable, les densités de dreissènes sont très importantes. Ainsi, des données relevées à Metz en 1995 faisaient état d'une densité s'échelonnant entre 1000 et 10 000 individus/m<sup>2</sup> (Bachmann *et al.*, 1997). Cependant, des travaux effectués quelques années plus tard ont montré un déclin de la population de dreissènes dans la Moselle. Ainsi, les densités relevées à Metz ont diminué de moitié entre les années 1996 et 2000 ; ce déclin a été attribué à l'arrivée d'une espèce d'amphipode, *Corophium curvispinum*, entrant en compétition avec la dreissène pour la colonisation du substrat. (Bachmann *et al.*, 2001).



**Figure 5 : *Dreissena polymorpha***

**A :** *Dreissènes* fixées sur un bloc prélevé dans la Moselle à La Maxe.

**B :** Variété de coloration des coquilles de *dreissènes* (Claudi et Mackie, 1994).

**C :** *Dreissènes* filtrant l'eau grâce à leurs siphons inhalant et exhalant (The Zebra Mussel Page, J.L. Ram, <http://www.science.wayne.edu/~jram/zmussel.htm>).



### III – Matériel biologique : *Dreissena polymorpha*

#### A – Caractéristiques biologiques et écologiques

La moule zébrée ou dreissène *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) est un invertébré aquatique appartenant à l'embranchement des mollusques et à la classe des lamellibranches ou bivalves.

Sa coquille est de type mytiliforme. Elle est ornée de zébrures sombres orientées dorso-ventralement (Figure 5) et dont la coloration peut varier de manière importante selon le type d'habitat (Morton, 1969a), voire même selon la qualité du milieu (Protasov, 1998). La taille des dreissènes peut atteindre au maximum 40 mm, mais la taille moyenne des adultes avoisine généralement 20 à 25 mm.

La dreissène est une espèce benthique coloniale relativement abondante dans les eaux douces, aussi bien dans les systèmes lentiques que dans les systèmes lotiques. Son mode de vie est dit sessile : grâce à son byssus, elle se fixe à différents types de substrats durs tels que les bois flottants, les pierres, les pontons, les coques de bateaux et également d'autres bivalves.

La maturité sexuelle est atteinte lorsque les dreissènes mesurent 9 à 10 mm, ce qui correspond à un âge de 1 à 2 ans. La dreissène est une espèce gonochorique à fécondation externe. Lorsque la température de l'eau atteint 12°C au printemps, le cycle reproducteur est amorcé par la maturation des gamètes. Les gamètes mâles et femelles sont ensuite libérés dans le milieu au début de l'été. Plusieurs pontes successives peuvent avoir lieu jusqu'à la fin de l'été. Après fécondation, les œufs se développent et libèrent à l'éclosion une larve véligère, qui se laissera tomber sur le fond et se fixera par un byssus. Si le substrat est défavorable, les jeunes dreissènes peuvent détacher leur byssus et se laisser entraîner par le courant jusqu'à ce qu'elles trouvent un substrat favorable (Sprung, 1987, 1989 ; Borcharding, 1991 ; Neumann et Jenner, 1992). Les dreissènes ont une longévité variant de 3 à 10 ans selon leur origine géographique (Mackie, 1993).

## B – La dreissène, une espèce exotique invasive

C'est à partir du 18<sup>ème</sup> siècle que *D. polymorpha* étend son aire de répartition des affluents de la Mer Noire et de la Mer Caspienne jusqu'à l'Europe de l'Ouest (Kinzelbach, 1992). Elle est apparue en France au début du 19<sup>ème</sup> siècle. Elle a été signalée pour la première fois en 1988 dans les grands lacs d'Amérique du Nord (Hebert *et al.*, 1989), où l'accroissement des populations pose aujourd'hui de nombreux problèmes tels que l'obstruction des canalisations de prise d'eau (Claudi et Mackie, 1994 ; Moreteau et Khalanski, 1994).

Son expansion à travers l'hémisphère nord a été permise par sa stratégie de reproduction et par son mode de dispersion (Morton, 1969b) : la moule zébrée produit en effet un grand nombre de larves (stratégie r) ; ces larves étant planctoniques, elles sont capables de se déplacer au gré des courants et peuvent ainsi coloniser de larges surfaces (Borcherding, 1991, 1992). Cependant, cette expansion n'aurait pas été si rapide sans l'intervention de l'homme. En développant les transports fluviaux, ce dernier a en effet favorisé la dispersion des organismes fixés sur les coques des navires et dans leurs eaux de ballast (Carlton, 1993). Suite à la phase d'introduction dans ces nouveaux milieux, l'installation et la prolifération des dreissènes sont favorisées par la tolérance de cette espèce à un large spectre de conditions environnementales. C'est une espèce dite euryèce, qu'on peut retrouver dans des milieux oligotrophes à eutrophes, saumâtres ou encore dans des milieux modérément pollués. Les gammes de tolérance à différents facteurs abiotiques sont résumées dans l'ouvrage de Claudie et Mackie (1994).

L'ensemble de ces caractéristiques (Ricciardi, 1998) a permis à la dreissène de coloniser la plupart des eaux tempérées froides de l'hémisphère nord.

## C – La dreissène, un organisme sentinelle

Les mollusques bivalves sont fréquemment utilisés comme organismes sentinelles dans les programmes de surveillance de la contamination des écosystèmes aquatiques (Viarengo et Canesi, 1991). En milieu marin, une expérience longue de plus de 20 ans a permis de confirmer l'intérêt des bivalves et notamment des mytilidés pour le suivi de la qualité des milieux marins et estuariens. Plus récemment, la dreissène a été utilisée pour la surveillance de la qualité des eaux douces et semble constituer un candidat idéal pour

remplir le rôle d'organisme sentinelle des écosystèmes dulçaquicoles (Leglize et Crochard, 1997 ; Burgeot *et al.*, 1999 ; de Lafontaine *et al.*, 2000 ; Smolders *et al.*, 2002). Des études réalisées au sein de notre laboratoire concernent notamment le suivi des effets occasionnés par l'exposition à différentes contaminations, au niveau physiologique (Mouabad et Pihan, 1992) ou histologique (Giamberini *et al.*, 1996 ; Giamberini et Pihan, 1997). Les capacités de bioaccumulation de divers composés tels que les métaux ont également été étudiées (Mersch *et al.*, 1996).

La dreissène répond aux critères définis par Phillips (1980) pour constituer un organisme bioindicateur

- large distribution géographique qui permet une utilisation répandue et rend possible la comparaison entre plusieurs sites d'étude
- abondance et taille permettant les analyses biologiques
- maintien possible en laboratoire
- sédentarité et capacité à intégrer dans le temps les variations d'un milieu donné
- mode de nutrition (la filtration permet un contact direct de l'organisme avec l'eau) et capacité à accumuler les contaminants
- relative tolérance aux stress environnementaux et aux stress contaminants

#### **D – Une propriété intéressante dans le cadre de nos travaux : la filtration**

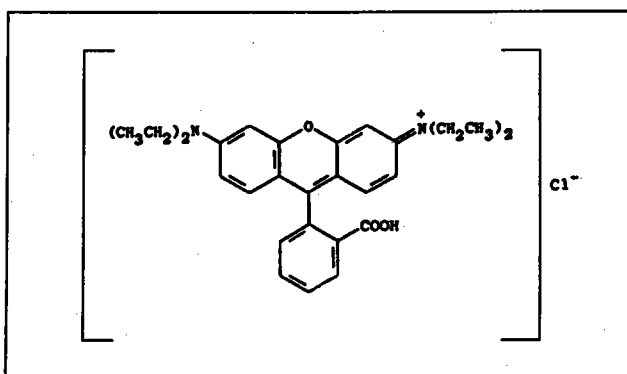
C'est essentiellement par le processus respiratoire et nutritionnel de la filtration que les bivalves sont exposés à la contamination de leur milieu. De plus, le protocole de mesure de l'activité MDMX (Chapitre 2.2) que nous avons choisi est une méthode qui consiste à exposer des organismes vivants à un colorant fluorescent, qu'ils accumulent par le biais de la filtration.

La dreissène est un organisme suspensivore. L'eau, aspirée par le siphon inhalant, passe sur les branchies de l'organisme qui en extrait oxygène et nourriture avant de la rejeter par le siphon exhalant (Figure 5 ; Morton, 1971). Les particules filtrées sont sélectionnées en fonction de leur taille. De 15 à 40µM (phytoplancton, zooplancton, débris organiques), elles sont ingérées alors que les particules de taille plus importantes sont englobées de mucus et rejetées sous forme de pseudofécès (Sprung et Rose, 1988). Les populations

naturelles de dreissènes sont capables de filtrer d'énormes quantités d'eau et jouent de ce fait un rôle non négligeable dans les phénomènes de sédimentation et de circulation des matières en suspension (Stanczykowska *et al.*, 1976), au point que des auteurs ont suggéré son utilisation pour l'épuration des eaux (Reeders *et al.*, 1989 ; Reeders et Bij de Vaate, 1992).

Différents paramètres peuvent moduler le taux de filtration :

- La température : en hiver, le taux de filtration est faible ; il augmente fortement au printemps, lorsque la température de l'eau atteint un seuil se situant entre 5 et 10°C. Pour des températures supérieures à 10°C, aucune relation significative n'existe entre la température et le taux de filtration. Cependant, des températures élevées (>20°C) semblent inhiber la filtration (Noordhuis *et al.*, 1992).
- Les matières en suspension : le taux de filtration diminue lorsque la concentration en matière en suspension augmente (Noordhuis *et al.*, 1992 ; Fanslow *et al.*, 1995).
- La taille : il existe une relation de type sigmoïde entre le taux de filtration et la longueur de la coquille. Les organismes les plus grands présentent de faibles taux de filtration, ce qui pourrait refléter une dégénérescence physique, étant donné que les organismes les plus grands sont également les plus âgés (Noordhuis *et al.*, 1992).



**Figure 6 :** Formule développée de la rhodamine B ou N-[9-(2-carboxyphényl)-6-(diéthylamino)-3H-xanthen-3-ylidene]-N-éthylétnanaminium chloride ou tétraéthylrhodamine

**Tableau VII :** Principales propriétés de la rhodamine B (d'après The Merck Index, 11<sup>ème</sup> édition).

Formule chimique	C <sub>28</sub> H <sub>31</sub> Cl N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
MR	479
Solubilité	Eau, alcool
DL <sub>50</sub>	Intraveineuse chez le rat : 89,5 mg/kg
Particularités	- Photodégradable en solution aqueuse : N-dééthylation initiée par la lumière visible (Ma et Yao, 1999) - Recyclage : oxyde de titane ou eau de javel

## IV – La rhodamine B, un marqueur de l'activité MDMX

### A – Propriétés, métabolisme et toxicité

La rhodamine B (N-[9-(2-carboxyphenyl)-6-(diéthylamino)-3H-xanthen-3-ylidene]-N-éthyletananaminium chloride ou tetraethylrhodamine) est un colorant fluorescent de la famille des xanthènes (Figure 6). Ses principales propriétés sont présentées dans le tableau VII.

La rhodamine B (RB) est considérée comme un marqueur très efficace présentant des applications dans le domaine de l'écologie et de l'étude du comportement animal. Ainsi, ce colorant a été utilisé chez de nombreuses espèces pour le marquage externe ou incorporé à des appâts (Fisher, 1999).

#### 1 – Métabolisme

Des travaux chez les mammifères ont montré que la RB était métabolisée par dé-éthylation enzymatique des groupes diéthylamine, formant ainsi des métabolites plus solubles que le composé parent (Webb et Hansen, 1961). Les réactions métaboliques de dégradation de la RB sont effectuées au niveau des microsomes du foie (Webb *et al.*, 1961). La RB et ses métabolites (fluorescents également) sont éliminés dans l'urine (Elliott *et al.*, 1990), les fécès, et dans une moindre mesure, par la bile (Webb *et al.*, 1961). Dans le cas des invertébrés aquatiques, une étude a montré que l'huître plate *Ostrea edulis* semblait capable d'éliminer complètement la RB par voie métabolique en 24 heures (Waugh et Key, 1967).

#### 2 – Toxicité générale

La RB apparaît comme le plus toxique des colorants xanthènes (Smart et Laidlaw, 1977), mais les doses ou concentrations létales chez diverses espèces sont relativement élevées (Tableau VIII). Des travaux sur la tolérance de plusieurs espèces d'algues, ainsi que sur la tolérance des œufs et larves de plusieurs espèces de mollusques, crustacés et

**Tableau VIII : Toxicité de la rhodamine B. Doses ou concentrations létales chez plusieurs organismes au cours de différents tests de toxicité (d'après Fisher, 1999).**

Test	Organisme	Valeur
Aigu, voie orale, DL <sub>50</sub>	Rat	> 500 mg/kg
Aigu, voie orale, DL <sub>50</sub>	Souris	890 mg/kg
Aigu, voie intraveineuse, DL <sub>50</sub>	Rat	89,5 mg/kg
Aigu, voie intrapéritonéale, DL <sub>50</sub>	Rat	90 mg/kg
Aigu, voie intrapéritonéale, DL <sub>50</sub>	Rat	120 mg/kg
Aigu, voie intrapéritonéale, DL <sub>50</sub>	Souris	95 mg/kg
CL <sub>50</sub> 96 h	Poisson	314 mg/L
CL <sub>50</sub> 48 h	<i>Daphnia</i> spp.	> 29 mg/L
CE <sub>50</sub> 95 h	Algues vertes	< 10 mg/L
CL <sub>50</sub> 24 h	<i>Gambusia affinis</i>	171 ppm

poissons à ce colorant ont permis de conclure que des concentrations jusqu'à 1 mg/L ( $2\mu\text{M}$ ) pendant 48 heures ne semblaient pas dommageables pour les écosystèmes aquatiques (Smart, 1984). Les larves d'huître *Crassostrea virginica* ne semblent pas affectées par une exposition de 48 heures à 1 mg/L ( $2\mu\text{M}$ ) ; par contre, un retard de croissance est observé pour une concentration de 10 mg/L ( $20\mu\text{M}$ ) ; à 100 mg/L ( $200\mu\text{M}$ ), les larves meurent en 2 jours (Panciera, 1967).

### 3 – Génotoxicité et mutagénicité

Les données concernant le potentiel génotoxique et mutagène de la RB sont variables et controversées. Alors que des études lui attribuent un caractère génotoxique et mutagène (Tripathy *et al.*, 1995), d'autres considèrent au contraire que la mutagénicité observée est attribuable aux impuretés présentes dans les préparations commerciales (Brown *et al.*, 1979).

### 4 – Cancérogénicité

Les données concernant la cancérogénicité de la RB sont peu nombreuses et peu concluantes. Elle est soupçonnée d'être cancérigène chez l'animal (Bonser *et al.*, 1956 ; Umeda, 1956). Mais globalement, les études disponibles donnent des résultats peu probants et peu fiables du fait d'un manque de contrôle ou de l'apparition de tumeurs chez les contrôles. L'IARC (International Agency for the Research on Cancer) classe la RB dans le groupe 3, c'est à dire dans le groupe pour lequel les preuves de la cancérogénicité pour l'homme n'ont pu être établies de manière certaine (IARC, 1978, 1987).

### 5 – Effets sur la santé humaine

Etant donné le manque de connaissance concernant les effets potentiels de la RB sur la santé humaine, un certain nombre de précautions ont été prises et son utilisation est restreinte aux produits pharmaceutiques, cosmétiques et aux applications externes. La RB

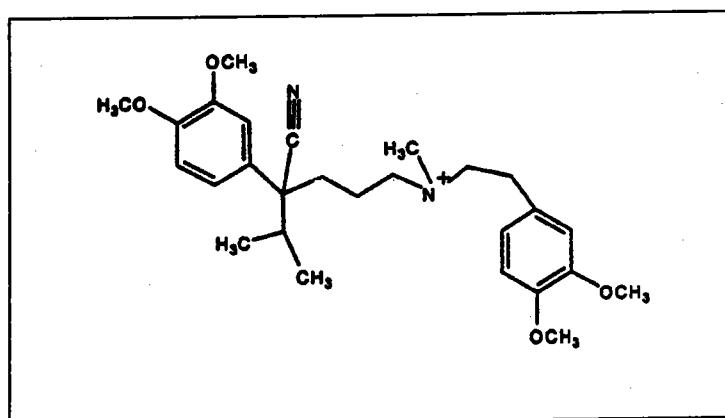


est considérée comme une substance relativement peu inquiétante pour la santé humaine dans la mesure où les règles de sécurité sont respectées (Field *et al.*, 1995).

## **B – La rhodamine B, un marqueur de l'activité MDMX**

Les colorants de la famille des rhodamines, tels que les rhodamines 123, 6G et B, sont couramment utilisés en tant que substrats des P-glycoprotéines mammaliennes dans le cadre de l'étude du phénomène MDR (Beck *et al.*, 1996 ; Eytan *et al.*, 1997).

Chez les invertébrés aquatiques, la RB ou la R123 sont utilisées comme marqueur de l'activité du système MDMX par des techniques mettant en évidence le transport de ce colorant au travers de la membrane (Toomey et Epel, 1993, 1995 ; Cornwall *et al.*, 1995 ; Galgani *et al.*, 1996 ; Smital et Kurelec, 1997, 1998b ; Eufemia et Epel, 2000 ; McFazden *et al.*, 2000). Ces composés pénètrent rapidement dans les cellules par diffusion passive et présentent une forte affinité pour les Pgps (Eytan *et al.*, 1997), ce qui explique leur efficacité en tant que marqueur de l'activité MDMX. Des travaux ont souligné que, parmi les différentes rhodamines, la RB permettait une meilleure sensibilité et semblait donc la plus appropriée à la mesure de l'activité MDMX chez les bivalves (Smital et Kurelec, 1997 ; Kurelec *et al.*, 2000 ; Smital *et al.*, 2000b).



**Figure 7 :** Formule développée du vérapamil ou  $\alpha$ -[3-[[2-(3,4-diméthoxyphényl) éthyl] méthylamino] propyl]-3,4-diméthoxy- $\alpha$ -(1-méthyléthyl)-benzèneacétonitrile ; 5-[(3,4-diméthoxyphénéthyl) méthylamino]-2-(3,4-diméthoxyphényl)-2-isopropylvaléronitrile.

**Tableau IX :** Principales propriétés du vérapamil (d'après The Merck Index, 11<sup>ème</sup> édition).

Formule chimique	C <sub>27</sub> H <sub>39</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
MR	491,1
Solubilité	Peu soluble dans le chloroforme Soluble dans l'eau, l'éthanol, l'isopropanol, l'acétone, l'acétate d'éthyle Très soluble dans le méthanol et le DMF
DL <sub>50</sub>	Intraveineuse chez le rat : 16 mg/kg Intraveineuse chez la souris : 8 mg/kg

**V – Le vérapamil, un inhibiteur de l'activité MDMX****A – Propriétés, métabolisme et toxicité**

Le vérapamil ou  $\alpha$ -[3-[[2-(3,4-diméthoxyphényl) éthyl] méthylamino] propyl]-3,4-diméthoxy- $\alpha$ -(1-méthyléthyl)-benzèneacétonitrile ; 5-[(3,4-diméthoxyphénéthyl) méthylamino]-2-(3,4-diméthoxyphényl)-2-isopropylvaléronitrile est un composé de la famille des phénylalkylamines (Figure 7). Ses principales propriétés sont présentées dans le tableau IX. Le vérapamil est un inhibiteur calcique spécifique, c'est-à-dire qu'il diminue les mouvements transmembranaires du calcium sans modifier les mouvements des autres ions. Il est utilisé en médecine comme anti-arythmique.

**1 – Métabolisme**

Le métabolisme du vérapamil au niveau des microsomes hépatiques fait intervenir plusieurs isoenzymes de la famille des cytochromes P450 et conduit à la formation de nombreux métabolites (Pauli-Magnus *et al.*, 2000). Les métabolites sont éliminés majoritairement par voie urinaire, et dans une moindre mesure, par voie digestive.

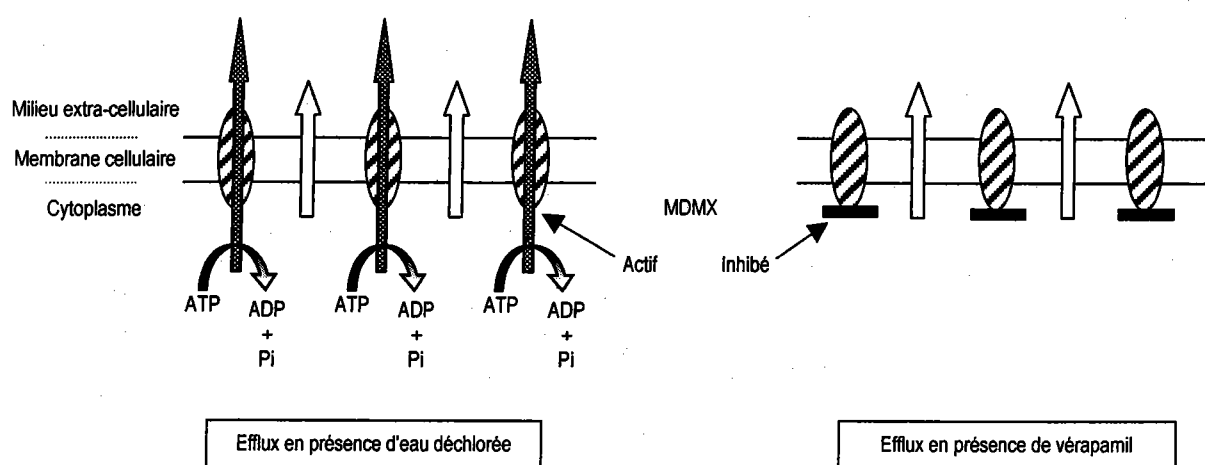
**2 – Toxicité**

A de fortes doses, des effets toxiques se manifestent, notamment au niveau cardiovasculaire (hypotension, dépression de l'activité des nœuds sinusal et auriculo-ventriculaire, bradycardie) ou au niveau hépatique. Les études chez l'animal n'ont pas mis en évidence d'effet tératogène. D'autres effets secondaires consécutifs à l'administration de vérapamil tels qu'une hyperglycémie liée à une inhibition de la libération d'insuline au niveau du pancréas, des acidoses métaboliques ou des œdèmes pulmonaires ont également été rapportés (Ramoska *et al.*, 1990). Des travaux portant sur des cultures d'hépatocytes de turbot n'ont montré aucun effet toxique après une exposition à 40  $\mu$ M de vérapamil pendant

une heure (Tutundjian *et al.*, 2002b). Des concentrations allant jusqu'à 60 $\mu$ M n'ont pas occasionné d'effets toxiques sur des cellules tumorales (Ferguson et Baguley, 1993).

## **B – Le vérapamil, un inhibiteur de l'activité MDMX**

Le vérapamil s'est avéré capable de moduler la résistance MDR *in vitro* et *in vivo* en inhibant l'action des transporteurs membranaires (Tsuruo *et al.*, 1981). Il a par la suite été montré que ce composé étant substrat des P-glycoprotéines, il en inhibe le fonctionnement sur le principe de l'inhibition compétitive (Yusa et Tsuruo, 1989). Sur la base de ces travaux, le vérapamil a été utilisé comme inhibiteur de l'activité MDMX chez les organismes aquatiques. Les concentrations en vérapamil généralement choisies s'échelonnent entre 10 et 20 $\mu$ M (Kurelec *et al.*, 2000), 20 $\mu$ M étant la concentration pour laquelle 80% de l'activité des Pgps est inhibée dans les cellules présentant le phénotype MDR (Ford et Hait, 1990). Il a de plus été montré que le vérapamil exerce un effet inhibiteur proportionnel à la concentration appliquée sur une gamme allant de 1 à 30 $\mu$ M (Smital et Kurelec, 1997).



**Figure 8 :** Schéma du principe de la méthode d'efflux. Lorsque l'efflux se déroule en présence d'eau déchlorée, l'ensemble des systèmes d'efflux sont activés : le MDMX (ovales rayés et flèches grises) et les autres systèmes dont la diffusion passive (flèches blanches). Lorsque l'efflux se déroule en présence de vérapamil, le MDMX est inhibé et seuls les autres systèmes d'efflux sont actifs. Par différence entre les deux situations, on estime l'activité MDMX.

## Chapitre 2.2 : Méthodes

### I – Méthode d'efflux

#### A – Principe de la méthode

La méthode d'efflux, initialement développée pour mesurer l'activité MDMX au niveau cellulaire ou tissulaire (Cornwall *et al.*, 1995), a été transposée à l'utilisation d'organismes vivants comme les bivalves. Le protocole utilisé pour évaluer l'activité MDMX au cours de cette étude (Parant et Pain, 2001) a été adapté de la méthode décrite chez *Dreissena polymorpha* et *Mytilus galloprovincialis* par Smital et Kurelec (1997). Cette méthode s'appuie sur le mode de fonctionnement du MDMX, à savoir sa capacité à expulser de la cellule les composés organiques lipophiles, et permet de mesurer l'activité MDMX en évaluant la quantité de substrat rejeté dans le milieu extracellulaire.

Durant une phase dite de charge, les organismes sont exposés à la rhodamine B (RB), un colorant fluorescent substrat du mécanisme MDMX. Etant de nature lipophile, le colorant pénètre rapidement dans les cellules par diffusion passive selon le gradient de concentration.

Une série de lavages est ensuite effectuée afin d'éliminer le colorant adsorbé sur le manteau et les coquilles des organismes.

Vient ensuite une phase dite d'efflux, au cours de laquelle les organismes sont placés dans un milieu exempt de colorant. Les cellules rejettent alors la RB accumulée vers le milieu extérieur. L'accroissement de la quantité de RB rejetée dans le milieu d'efflux en fonction du temps est évaluée en fluorimétrie. La cinétique d'efflux obtenue permet d'apprécier la vitesse d'élimination cellulaire du composé fluorescent.

Les mécanismes mis en jeu au cours de l'efflux sont de différentes natures : outre le mécanisme MDMX, la diffusion passive ainsi que divers autres mécanismes actifs d'excrétion cellulaire sont également mobilisés (Figure 8).

Afin d'évaluer la part de l'efflux réellement attribuable au MDMX, deux mesures sont effectuées (Figure 8). Dans le premier cas, la phase d'efflux s'effectue en eau de conduite



**Figure 9 :** *Panier en grillage (10x3 cm). Au cours de la mesure de l'activité MDMX, chaque lot de dreissènes est placé dans un panier de ce type, afin d'éviter la manipulation directe des organismes par l'expérimentateur.*

déchlorée (eau de conduite passée sur charbon actif). On met alors en évidence la capacité totale des cellules branchiales des dreissènes à rejeter la RB vers le milieu extérieur. Dans l'autre cas, elle est réalisée en présence d'un composé inhibiteur du MDMX, le vérapamil. Ce composé pénètre rapidement dans la cellule, entre en compétition avec la RB et inhibe ainsi son efflux. On met alors en évidence l'action de tous les autres mécanismes d'excrétion cellulaire intervenant dans l'efflux. La part de l'efflux associée à l'activité MDMX est évaluée par différence entre les deux mesures.

## **B – Dispositif expérimental**

La mesure de l'activité MDMX chez *Dreissena polymorpha* a nécessité des adaptations du protocole initial développé par Smital et Kurelec (1997). Le travail de mise au point et les modifications apportées sont décrites dans le chapitre 3.1 de ce document (Parant et Pain, 2001).

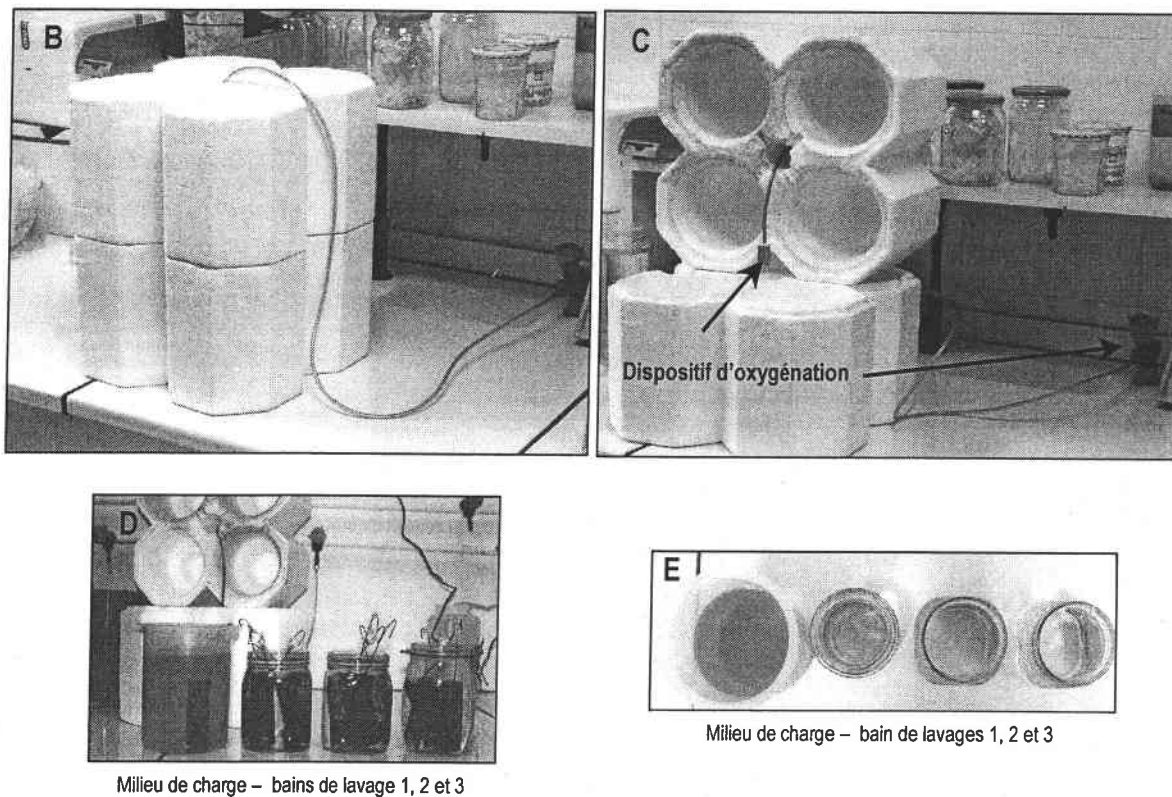
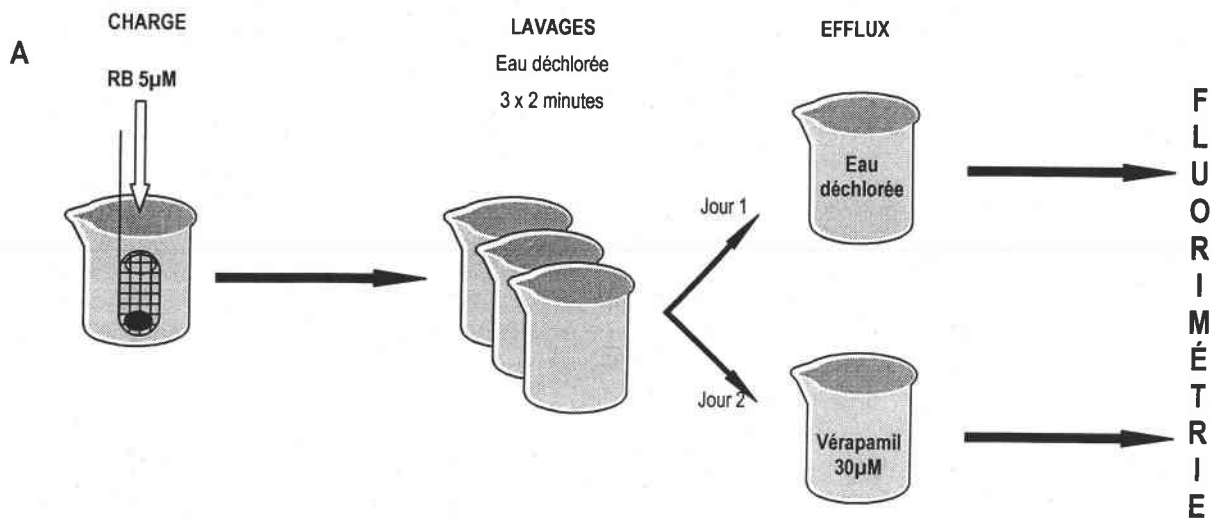
### **1 – Généralités**

La mesure de l'activité MDMX est généralement effectuée en triplicats ; le nombre de réplicats est augmenté dès que l'expérimentation le permet. Chaque réplicat est composé de cinq dreissènes adultes de taille équivalente (18-22 mm). Tous les milieux utilisés pendant la mesure sont dilués avec l'eau de conduite déchlorée (par passage sur charbon actif), le chlore étant élément toxique pour les dreissènes.

### **2 – Acclimatation**

La mesure de l'activité MDMX chez les dreissènes vivantes nécessite la prise en compte du temps d'adaptation des dreissènes à l'environnement du laboratoire. Il est en effet primordial, pour le bon déroulement de la mesure, que les dreissènes puissent filtrer normalement. Afin de limiter le stress, les organismes sont placés par groupe de cinq dans des paniers fabriqués en grillage (10x3 cm ; Figure 9) la veille de chaque mesure. L'utilisation de paniers permet d'une part d'éviter tout contact avec l'expérimentateur





**Figure 10 : Dispositif expérimental**

**A** : Schéma du dispositif expérimental et du déroulement de la mesure.

**B – C** : Dispositif utilisé pour l'étape de charge permettant le maintien des organismes à l'obscurité et l'oxygénation du milieu de charge (**B** : dispositif fermé ; **C** : dispositif ouvert).

**D – E** : Déroulement de l'étape de lavage constituée par trois bains d'eau déchlorée de 2 minutes chacun (**D**) et mise en évidence de la désorption de la RB adsorbée de manière non spécifique sur les organismes et les paniers (**E**).

pendant la manipulation des lots et d'autre part, de favoriser l'acclimatation des dreissènes ; en effet, elles sécrètent assez rapidement des filaments byssaux et se fixent sur le panier ou se fixent les unes aux autres.

### **3 – Mesure de l'activité MDMX**

Deux jours sont nécessaires à la mesure. Dans un premier temps, on mesure l'efflux dans l'eau déchlorée. Les dreissènes sont ensuite replacées dans leur milieu (eau déchlorée, eau naturelle prélevée sur le terrain ou milieu d'exposition selon l'expérimentation en cours). Le lendemain, la mesure de l'efflux est effectuée en présence de l'inhibiteur. Chaque mesure comprend trois étapes : charge, lavages et efflux (Figure 10-A).

#### **3.1 – Etape de charge**

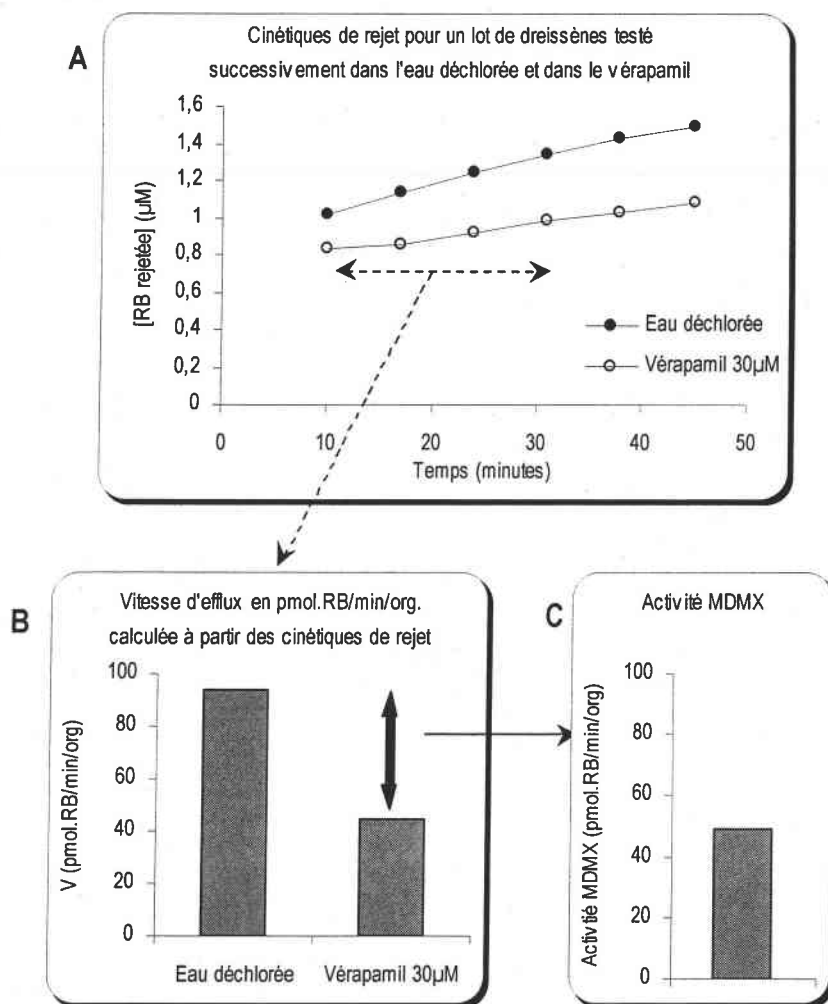
Le jour de la mesure, les paniers contenant les dreissènes sont placés dans une solution de RB à 5 $\mu$ M (150 mL par lot de 5 dreissènes) pendant 4 heures. Cette étape s'effectue à l'obscurité dans un dispositif qui permet également d'assurer une oxygénation constante du milieu d'exposition (Figures 10-B et 10-C). Dès les premières minutes de l'exposition, l'ouverture de la coquille et l'extension des siphons sont les témoins d'une filtration active permettant l'accumulation cellulaire du traceur fluorescent.

#### **3.2 – Etape de lavage**

Suite à l'exposition, les dreissènes sont successivement lavées dans trois bains d'eau déchlorée de deux minutes, afin de permettre l'élimination du colorant accumulé dans le manteau et adsorbé sur les coquilles (Figure 10-D et 10-E).

#### **3.3 – Etape d'efflux**

Cette dernière étape, dite d'efflux, diffère entre les deux jours de mesure. Chaque lot de dreissènes est placé dans 30 mL d'eau déchlorée le premier jour (mesure de l'efflux total),



**Figure 11** : Traitement des données acquises en fluorimétrie par la méthode d'efflux.

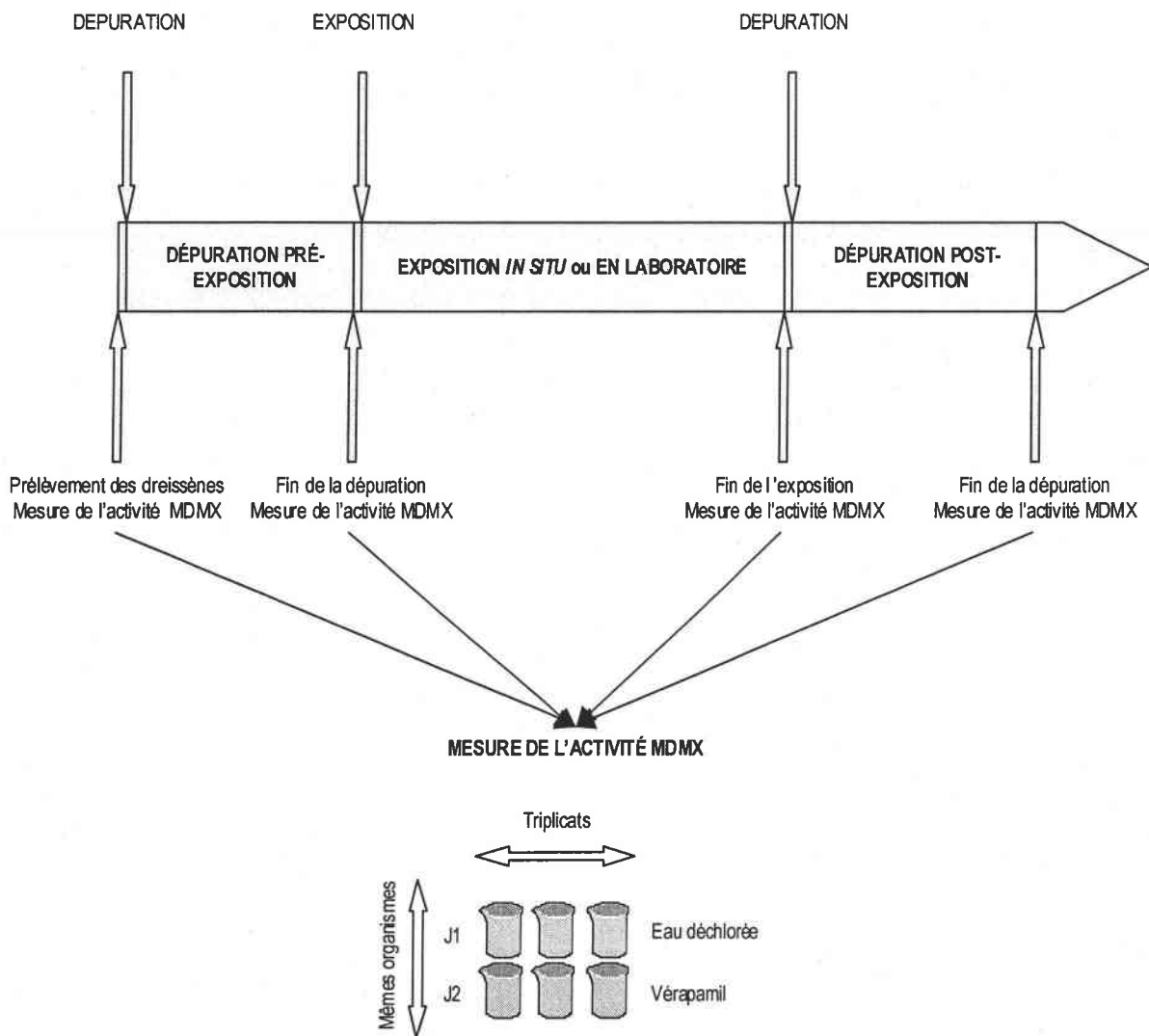
A partir des cinétiques de rejet de la RB en présence d'eau déchlorée et en présence de vérapamil 30μM (A), les vitesses d'efflux exprimées en picomoles de RB rejetée par minute et par organisme sont calculées (B). Par différence entre les deux vitesses d'efflux calculées, on estime l'activité MDMX (C).

et dans 30 mL d'une solution de vérapamil à 30 $\mu$ M le deuxième jour (inhibition du MDMX). Durant cette phase, les dreissènes rejettent le colorant accumulé au cours de l'étape de charge. Toutes les 5, 7 ou 10 minutes (selon le nombre de lots testés au cours de l'expérimentation), on prélève 100 $\mu$ l en duplicat du milieu d'efflux, que l'on dépose sur une microplaque. La concentration en RB présente dans le milieu au temps  $t$  considéré est ensuite mesurée en fluorimétrie (excitation 544 nm, émission 590 nm ; Fluostar, BMGLabTechnologies). Au bout d'une heure, on peut visualiser la cinétique d'efflux de la RB, c'est à dire l'évolution de la concentration en RB présente dans le milieu en fonction du temps (Figure 11-A).

### C – Traitement des résultats

A partir des cinétiques d'efflux obtenues, la vitesse initiale d'efflux de la RB est estimée. Cette vitesse correspond à la pente de la partie linéaire habituellement observée entre 10 et 30 minutes d'efflux ( $r_{\text{Pearson}}, p < 0,05$ ) (Figure 11-B). Les vitesses d'efflux sont exprimées en picomoles de RB rejetée par minute et par organisme (pmol. RB/min/org).

La différence entre les vitesses d'efflux de la RB en présence d'eau déchlorée et de vérapamil constitue l'activité MDMX (Figure 11-C). Les moyennes et écart-types des vitesses d'efflux obtenues pour chaque triplicat sont présentées sous forme d'histogrammes. Le traitement statistique de ces résultats est effectué par le test  $t$  de Student ( $\alpha=0,05$ ) à l'aide du logiciel Statistica (Statsoft, version 1999). D'autres analyses ont été nécessaires pour traiter les résultats présentés dans les chapitres 3.2 et 3.4. Elles seront détaillées lors de la présentation des expérimentations correspondantes.



**Figure 12 :** Déroulement des expérimentations visant à exposer les dreissènes à différents stress. Après une période de dépuraton, les dreissènes sont exposées *in situ* ou en laboratoire à des eaux naturellement ou artificiellement contaminées. Les dreissènes subissent ensuite une nouvelle période de dépuraton. Les niveaux d'activité MDMX sont contrôlés à chaque étape par la méthode d'efflux. Il est à noter que la durée des différentes étapes peut être variable selon les cas ; elle sera précisée ultérieurement lors de la description des expérimentations.

## II – Exploitation de la méthode d'efflux

Le protocole de dosage de l'activité MDMX chez les bivalves peut être exploité de deux manières. D'une part, il permet de mesurer le niveau d'activité présenté par des organismes exposés à différents milieux. Il est ainsi possible de mettre en évidence les variations du niveau d'activation du système d'efflux et donc du système de défense incarné par le MDMX en fonction des conditions du milieu. D'autre part, ce protocole permet la détection dans les eaux naturelles de composés organiques substrats du MDMX. Ce dosage consiste à mesurer l'effet inhibiteur d'une eau naturelle sur la cinétique d'efflux de la RB. Plus l'eau est chargée en composés organiques substrats, plus la cinétique d'efflux est inhibée. Le potentiel inhibiteur exercé par l'eau testée peut être comparé à celui exercé par le vérapamil.

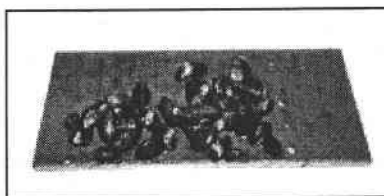
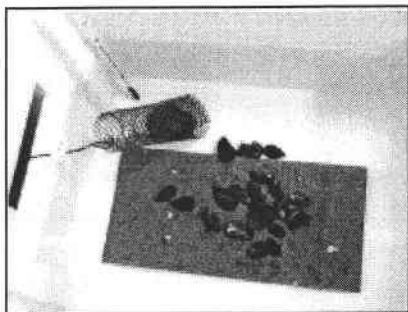
### **A – Mesure des niveaux d'activité MDMX chez des dreissènes exposées à différents stress**

L'objectif de cette mesure consiste à mettre en évidence un éventuel impact de la pollution organique du milieu aquatique sur les bivalves qui y vivent. En ce qui nous concerne, cet impact se caractérise par une induction de l'activité MDMX qui reflète la nécessité d'accroître l'efficacité des systèmes de défense. Afin de mesurer l'induction de l'activité MDMX, des dreissènes sont transférées sur des sites contaminés ou exposées en laboratoire à des milieux naturels ou synthétiques contaminés. La figure 12 présente un schéma résumant le protocole de ce type d'expérimentation. La mesure de l'activité MDMX est effectuée selon le protocole décrit dans ce chapitre (§ I-B-3).

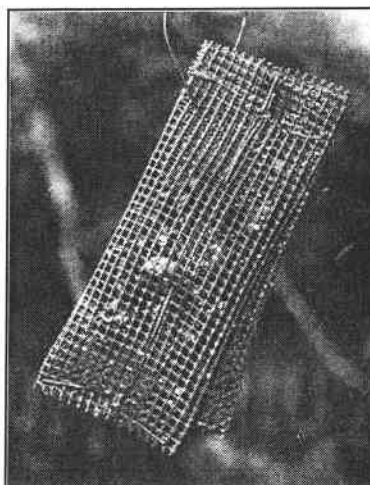
#### **1 – Prélèvement des dreissènes**

Les dreissènes adultes, de taille comprise entre 18 et 22 mm, sont prélevées dans la Moselle au niveau de la commune de La Maxe. Elles sont détachées de leur substrat par section du byssus à l'aide d'un scalpel, afin de préserver leur intégrité. Les organismes sont ensuite transportés au laboratoire dans une glacière contenant l'eau du lieu de prélèvement.

A



B



**Figure 13 :** Dispositifs utilisés pour l'exposition des dreissènes :

**A :** en laboratoire, les dreissènes sont fixées sur des carrelages placés au fond de bacs en polypropylène.

**B :** sur le terrain, les dreissènes sont enfermées dans des cages en grillage (20x9 cm) attachées aux arbres environnants par un fil de fer.

## 2 – Dépuration pré-exposition

Après leur arrivée au laboratoire, les dreissènes sont maintenues dans l'eau de leur site d'origine oxygénée par un dispositif d'aération. Le lendemain, le niveau d'activité présenté par les dreissènes prélevées est contrôlé par la méthode d'efflux. La mesure est généralement effectuée sur trois lots de cinq dreissènes. Après la mesure, les dreissènes sont placées dans des bacs en polypropylène contenant de l'eau de conduite déchlorée (à raison de 10 à 30 dreissènes par litre) additionnée de nourriture congelée pour invertébrés aquatiques constituée de phytoplancton, zooplancton, moules et oligoéléments (Nauplium). Des carrelages placés au fond des bacs permettent la fixation des dreissènes et facilitent leur acclimatation au laboratoire (Figure 13-A). L'eau, correctement oxygénée, est maintenue à une température constante de 16-17°C et renouvelée tous les deux jours. La photopériode est également contrôlée (14 heures d'illumination par jour).

Cette étape a pour objectif la réduction du niveau d'activité MDMX jusqu'à un niveau faible que l'on puisse considérer comme basal. A l'issue de nos travaux, la durée optimale de la dépuration a été estimée à 8 jours, à la suite desquels le niveau d'activité est à nouveau contrôlé afin de vérifier sa décroissance. Cette mesure est effectuée sur les lots testés au début de la dépuration. Il est à noter que les expérimentations décrites dans les prochains chapitres n'ont pas toujours exactement respecté le délai de 8 jours dans la mesure où celui-ci n'a été établi qu'après plusieurs mois de travaux. Les niveaux d'activité présentés par les organismes avant exposition ont toutefois été systématiquement évalués après quelques jours passés en eau déchlorée en laboratoire.

## 3 – Exposition des dreissènes *in situ* ou en laboratoire

Lors d'exposition *in situ* les dreissènes sont placées dans des cages fabriquées en grillage (20x9 cm) et immergées sur les sites d'études (Figure 13-B). Les durées d'exposition sont variables et seront spécifiées au moment de la présentation de chaque expérimentation. Après la période d'exposition ou à chaque durée d'exposition étudiée, les organismes sont ramenés au laboratoire dans des glacières contenant l'eau des sites.

En laboratoire, les dreissènes sont exposées à des eaux naturelles prélevées sur le terrain ou à des milieux contaminés expérimentalement. L'exposition est généralement réalisée



dans des bacs en polypropylène (eaux naturelles) ou en verre (milieux contaminés expérimentalement). Les dreissènes utilisées pour la mesure sont placées dans les paniers (Figure 9). Un stock de dreissènes supplémentaires est prévu en cas de mortalité. Ces dreissènes sont fixées sur des carrelages placés au fond du bac (figure 13-A). De la même manière que lors des expositions *in situ*, les durées d'exposition sont variables et seront précisées pour chaque expérimentation.

Les niveaux d'activité MDMX chez les dreissènes exposées sont contrôlés à chaque durée d'exposition étudiée.

#### 4 – Dépuration post-exposition

Après la période d'exposition *in situ* ou en laboratoire, il est possible de visualiser le retour de l'activité MDMX à un niveau basal en remplaçant les dreissènes en eau propre, en l'occurrence en eau déchlorée. Cette période de dépuration dure généralement 6 à 10 jours, à la suite desquels l'activité MDMX est contrôlée ; dans certains cas, des temps intermédiaires ont été testés.

#### 5 – Suivi de la mortalité et du taux de fixation

Lors de certaines expérimentations, la mortalité des dreissènes (expérimentations en laboratoire et *in situ*) et/ou leur taux de fixation au substrat disponible (expérimentations en laboratoire) ont été contrôlés. Le suivi de ces deux paramètres permet de disposer d'une évaluation de l'état de santé des organismes et d'une évaluation du stress occasionné par l'exposition (Smolders *et al.*, 2002).

## **B – Mesure du potentiel inhibiteur des eaux**

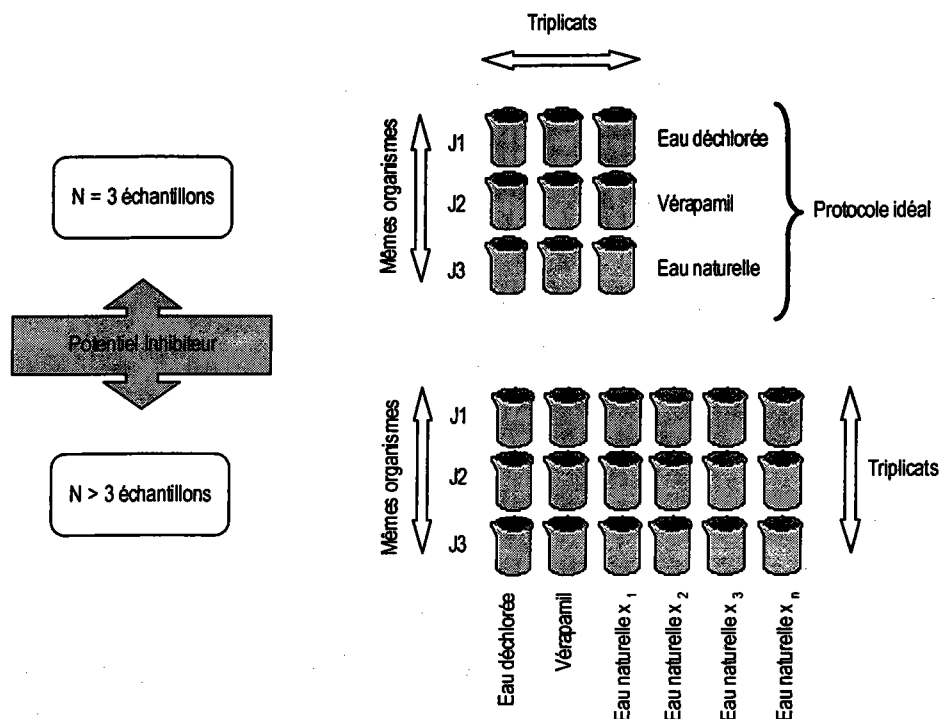
Mesurer le potentiel inhibiteur d'une eau naturelle consiste à mettre en évidence l'effet qu'elle exerce sur la cinétique de rejet de la RB au cours de la phase d'efflux. En ce sens, cette mesure revient à évaluer la présence dans l'eau testée de composés organiques substrats du MDMX. Les composés substrats entrent en effet en compétition avec la RB au cours de la phase d'efflux selon le même principe que celui décrit pour le vérapamil (Figure 8). L'inhibition mesurée est alors d'autant plus prononcée que la charge en composés substrats est importante. Les résultats obtenus sur la base des cinétiques de rejet permettent de calculer le potentiel inhibiteur des eaux.

### **1 – Prélèvement des dreissènes et maintien en laboratoire**

Les dreissènes utilisées pour la mesure du potentiel inhibiteur proviennent toutes du site de La Maxe en Moselle et sont prélevées selon le protocole décrit dans ce chapitre (§ II-A-1). Après le prélèvement, les dreissènes sont acclimatées en laboratoire pendant deux à cinq jours où elles sont fixées sur des carrelages dans des bacs en polypropylène contenant de l'eau déchlorée. Les volumes d'eau déchlorée, les conditions de température, éclairage et nourriture sont les mêmes que celles décrites précédemment (ce chapitre, § II-A-2).

### **2 – Prélèvement d'eaux**

Les échantillons d'eau à tester sont prélevés directement sur les sites d'études dans des bouteilles en verre brun de contenance 150 à 200 mL. Ils sont ramenés au laboratoire et conservés en chambre froide (4°C, obscurité) jusqu'à leur utilisation pour l'étude du potentiel inhibiteur.



**Figure 14 : Déroulement de la mesure du potentiel inhibiteur.**

Dans le premier cas ( $N = 3$ ), on compare le potentiel inhibiteur d'une eau naturelle à celui du vérapamil. L'efflux est réalisé dans trois milieux (eau naturelle à tester, eau déchlorée et vérapamil à  $30\mu\text{M}$ ). Le dosage est effectué en triplicats sur trois jours avec les mêmes lots de dreissènes.

Dans le second cas ( $N > 3$ ), on compare les potentiels inhibiteurs de deux ou plusieurs eaux naturelles à celui du vérapamil. Tous les milieux à étudier sont testés en parallèle le même jour avec des lots différents de dreissènes issues de la même population. Le dosage est répété trois fois (J1, J2, J3) avec les mêmes lots d'organismes afin d'obtenir des triplicats.

### 3 – Mesure du potentiel inhibiteur

La mesure du potentiel inhibiteur consiste à mesurer l'activité MDMX chez des dreissènes selon le protocole décrit dans ce chapitre (§ I-B-3). Pendant la phase d'efflux, les dreissènes sont exposées aux différentes eaux à tester. Deux lots témoins sont exposés à l'eau déchlorée et à une solution de vérapamil à 30µM.

Le protocole utilisé a été inspiré de celui défini par Smital et Kurelec (1997), qui proposent d'évaluer et de comparer le potentiel inhibiteur de plusieurs eaux naturelles à partir de différents lots d'organismes. Afin d'améliorer la précision des résultats, nous avons cherché à évaluer le potentiel inhibiteur à partir du même lot d'organismes. Cependant, en raison de contraintes techniques, ce protocole n'est pas applicable à toutes les situations.

Ainsi, selon le nombre d'échantillons d'eau à tester, le protocole a été aménagé de deux manières différentes (Figure 14) :

Dans le cas où l'on souhaite comparer le potentiel inhibiteur d'une eau naturelle à celui du vérapamil, l'efflux doit être réalisé dans trois milieux (eau naturelle à tester, eau déchlorée et vérapamil). Le dosage est effectué en triplicats sur trois jours : le premier jour (J1) trois lots de dreissènes sont exposés à l'eau déchlorée au cours de l'efflux. Le deuxième jour (J2), les mêmes lots sont exposés au vérapamil, puis le troisième jour (J3), ils sont exposés à un échantillon d'eau naturelle. Ce protocole permet d'accroître la précision des résultats et améliore la fiabilité des comparaisons effectuées.

Dans le cas où l'on souhaite comparer les potentiels inhibiteurs de deux ou plusieurs eaux naturelles à celui du vérapamil, le nombre d'échantillons à tester au cours de l'efflux devient supérieur à trois. Afin de respecter le protocole précédent, il faudrait répéter les mesures sur les mêmes organismes plus de trois jours. Il a été vérifié que la répétition d'un même dosage pendant trois jours sur les mêmes organismes permettait l'obtention de résultats reproductibles. Des tests plus longs n'ont pas été effectués, mais on peut supposer qu'utiliser les mêmes dreissènes plus de trois jours consécutifs occasionnerait probablement un stress trop important pour les organismes et ne garantirait alors plus la validité des résultats (Chapitre 3.1 § III). Dans ce cas, le protocole de Smital et Kurelec (1997) est appliqué en testant en parallèle tous les milieux le même jour avec des lots de

dreissènes différents, mais issus de la même population et soumis aux mêmes traitements. Le dosage est répété trois fois (J1, J2, J3) avec les mêmes lots organismes afin d'obtenir des triplicats. Bien que ce protocole ne permette pas une mesure aussi précise que précédemment, il permet toutefois d'estimer le potentiel inhibiteur d'un plus grand nombre d'échantillons d'eau.

#### 4 – Traitement des résultats

Les résultats obtenus sur la base des cinétiques de rejet permettent de calculer le potentiel inhibiteur des eaux. Il est exprimé en pourcentage et correspond à l'inhibition exercée par les eaux testées rapportée à l'efflux dans l'eau déchlorée ou dans une eau naturelle témoin selon la formule suivante :

$$PI = (Zone\ d'inhibition / V_{eau\ témoin}) \times 100$$

Où :

**Zone d'inhibition** = différence entre la vitesse d'efflux obtenue en présence du milieu témoin (eau déchlorée ou eau naturelle témoin) et la vitesse d'efflux obtenue en présence de l'eau à tester,

$V_{eau\ témoin}$  = vitesse d'efflux obtenue dans le milieu témoin (eau déchlorée ou eau naturelle témoin).

*Les protocoles précédemment décrits sont apparus comme étant les mieux adaptés à la mesure de l'activité MDMX et du potentiel inhibiteur chez la dreissène à l'issue de l'ensemble des travaux de cette thèse. La majorité des expérimentations qui seront décrites par la suite ont participé à sa mise au point, ce qui explique que des procédures parfois différentes aient été employées, notamment en ce qui concerne les durées des différentes étapes.*

### III – Méthode d'accumulation

#### A – Principe de la méthode

Tout comme la méthode d'efflux, la méthode d'accumulation s'appuie sur le mode de fonctionnement du MDMX, à savoir sa capacité à expulser de la cellule les composés organiques lipophiles. Après une étape de charge où les dreissènes sont exposées à la RB, on mesure non plus la quantité de substrat rejeté, mais la quantité de substrat restant piégé à l'intérieur des cellules. La mesure du niveau d'accumulation au sein des cellules permet d'estimer l'activité MDMX, sachant que l'accumulation du substrat est d'autant plus faible que l'activité est élevée. Cette méthode est couramment utilisée chez les bivalves et a été adaptée par différents auteurs à l'évaluation de l'accumulation dans les tissus (Kurelec et Pivcevic, 1991) ou dans les cellules isolées (Cornwall *et al.*, 1995 ; Minier et Moore, 1996).

Au cours de ce travail, la méthode d'accumulation a été utilisée afin de vérifier l'efficacité de l'étape de charge réalisée lors de la mesure de l'activité MDMX par la méthode d'efflux.

#### B – Dispositif expérimental

Les mesures sont réalisées en triplicat. Chaque réplicat est composé de cinq dreissènes adultes de taille équivalente (18-22 mm). Les dreissènes sont acclimatées en laboratoire avant toute expérimentation selon le protocole décrit dans ce chapitre (§ I-B-2). Tous les milieux utilisés pendant la mesure sont dilués avec l'eau déchlorée.

## **1 – Etape de charge**

Les dreissènes sont exposées à une solution de RB à 5 $\mu$ M (150 mL par lot de 5 dreissènes) pendant 4 heures. Le dispositif utilisé est le même que celui décrit pour la méthode d'efflux dans ce chapitre (§ I-B-3).

## **2 – Etape de lavage**

Suite à l'exposition, les dreissènes sont successivement lavées dans trois bains d'eau déchlorée de deux minutes, afin de permettre l'élimination du colorant accumulé dans le manteau et adsorbé sur les coquilles.

## **3 – Mesure de l'accumulation cellulaire de RB**

Après lavage, les dreissènes sont disséquées afin de prélever les branchies. Les branchies sont ensuite séchées sur papier absorbant, pesées, puis broyées à l'aide d'un homogénéisateur de type Dounce dans 1mL d'eau distillée. Enfin, les homogénats sont soniqués (30 secondes ; 16 kHz) puis centrifugés à 1250xg pendant 5 minutes. Le surnageant est conservé pour la mesure en fluorimétrie (excitation 544 nm ; émission 590 nm). Les résultats sont exprimés en unités de fluorescence accumulée par mg de branchies.

## IV – Analyses physico-chimiques

Les expérimentations effectuées sur le terrain ont consisté à évaluer la modulation de l'activité MDMX lorsque les dreissènes sont exposées à différents milieux de qualité physico-chimique variable. Dans le but de confronter les résultats obtenus par notre méthode avec la qualité des milieux étudiés, nous avons recueilli les données concernant la physico-chimie des sites.

Les données concernant la qualité physico-chimique proviennent de la Banque de l'Eau Rhin-Meuse (BERM) qui réalise des suivis poussés des rivières du bassin versant Rhin-Meuse. Les données physico-chimiques sont produites soit par l'Agence de l'Eau Rhin-Meuse (AERM), soit par les DIRENs régionales concernées par les différents cours d'eau étudiés (Directions Régionales de l'Environnement) (<http://www.eau-rhin-meuse.fr/BERM/HTM/>)

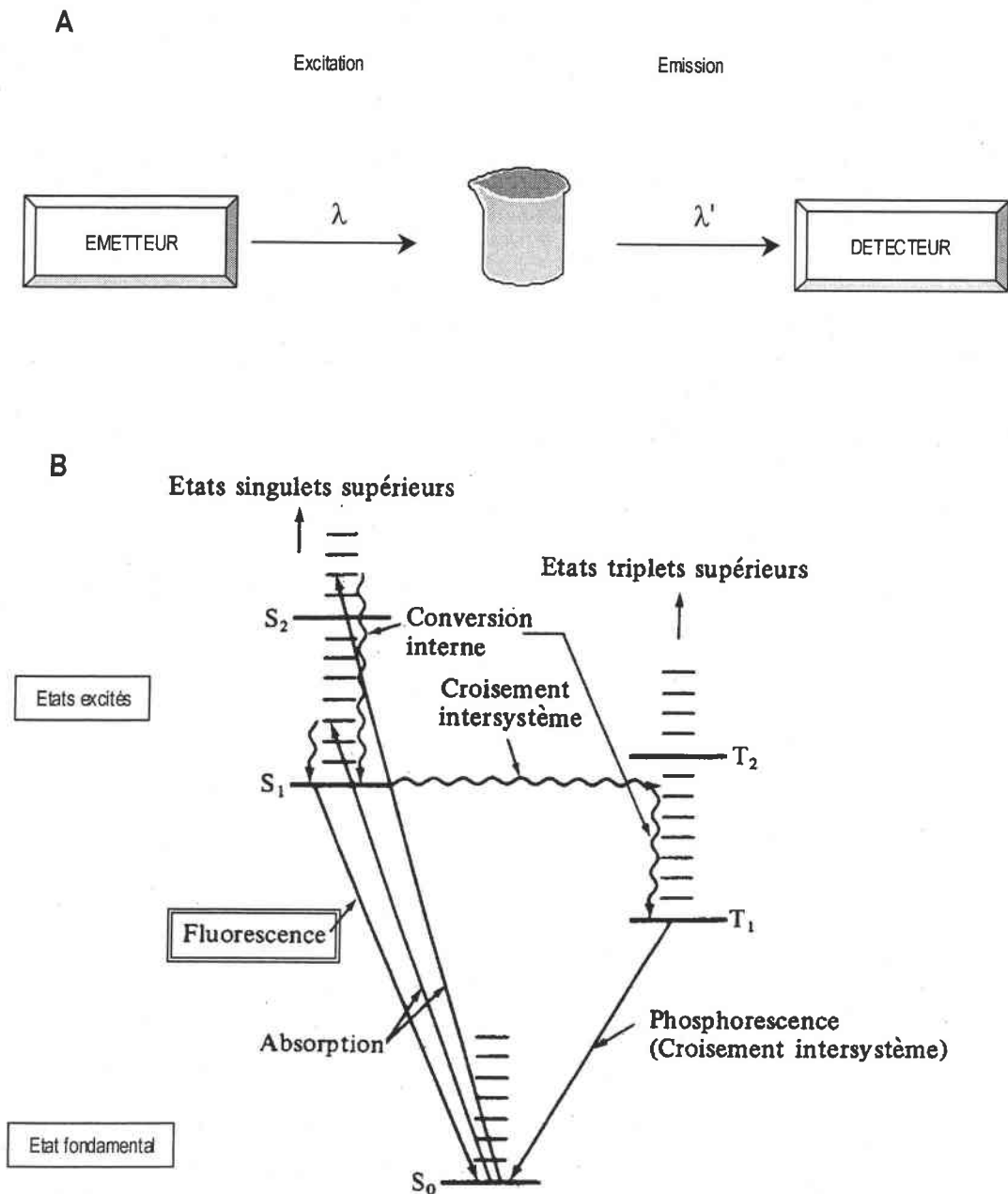
En complément, des analyses physico-chimiques des eaux aux dates étudiées ont été réalisées. Des échantillons d'eau provenant des sites étudiés ont été prélevés dans des bidons en polyéthylène de 2L. Ils ont été ramenés au laboratoire et conservés en chambre froide (4°C, obscurité) jusqu'à leur utilisation pour les analyses physico-chimiques, effectuées dans notre laboratoire.

Au cours de plusieurs expérimentations la composante majeure de la contamination des sites était susceptible d'être représentée par des composés organo-halogénés. Au cours de ces expérimentations, des échantillons d'eau ont été prélevés dans des bouteilles en verre bruns de 1L, ramenés en laboratoire et conservés en chambre froide (4°C, obscurité) jusqu'à la réalisation des dosages. Les dosages des composés organo-halogénés adsorbables (AOX) ont été effectués par IRH-Environnement (Nancy).



## CHAPITRE 3 : RESULTATS

- CHAPITRE 3.1 : ELEMENTS DE MISE AU POINT DE LA METHODE D'EFFLUX  
CHEZ *DREISSENA POLYMORPHA*
- CHAPITRE 3.2 : DEPURATION DE L'ACTIVITE MDMX ET ACTIVITE BASALE
- CHAPITRE 3.3 : COMPORTEMENT DE L'ACTIVITE MDMX CHEZ *DREISSENA*  
*POLYMORPHA* EXPOSEE A DIFFERENTS STRESS ET  
POTENTIEL INHIBITEUR
- CHAPITRE 3.4 : SUIVI SAISONNIER DE L'ACTIVITE MDMX CHEZ *DREISSENA*  
*POLYMORPHA* TRANSFEREE EN MOSELLE



**Figure 15 : Principe de la fluorimétrie.**

Les molécules absorbent la lumière à une longueur d'onde donnée ( $\lambda$ ) dite d'excitation (A). L'énergie ainsi absorbée permet le passage des atomes d'un état fondamental à un état excité dit singulet (B). L'état excité est un état énergétique instable. Dans le cas de la fluorescence, l'énergie est dissipée sous forme d'une lumière émise à une longueur d'onde  $\lambda'$  dite d'émission (A) (d'après Allinger et al., 1992).

## Chapitre 3.1 : Éléments de mise au point de la méthode d'efflux chez *Dreissena polymorpha*

Une partie de ce travail de recherche a été consacrée à l'adaptation de la méthode d'efflux initialement proposée par Smital et Kurelec (1997). Le présent chapitre recense les différents éléments de ce protocole qui ont nécessité une mise au point, notamment en ce qui concerne l'utilisation de la rhodamine B (RB) en tant que marqueur et de la fluorimétrie en tant que technique de mesure. L'efficacité des différentes étapes de la méthode d'efflux a également été vérifiée et ce travail a permis d'augmenter la fiabilité du protocole (Parant et Pain, 2001). Enfin, une fois les mises au point techniques effectuées, il s'est avéré nécessaire d'aménager le protocole de manière à limiter les sources de variabilité de la réponse liées à l'utilisation d'organismes vivants.

### I – Evaluation de l'efflux de rhodamine B en fluorimétrie

#### A – Principe de la fluorimétrie

Les composés fluorescents absorbent la lumière à une longueur d'onde donnée. L'énergie ainsi absorbée permet le passage des atomes d'un état fondamental à un état excité dit singulet. L'état excité étant un état énergétique instable, l'énergie est alors dissipée sous plusieurs formes (Figure 15). Dans le cas de la fluorescence, l'énergie est dissipée sous forme d'une lumière émise à une longueur d'onde spécifique (Allinger *et al.*, 1992). La mesure de l'intensité de la fluorescence émise donne une évaluation de la concentration en composés fluorescents dans l'échantillon étudié.

## B – Paramétrage du fluorimètre utilisé

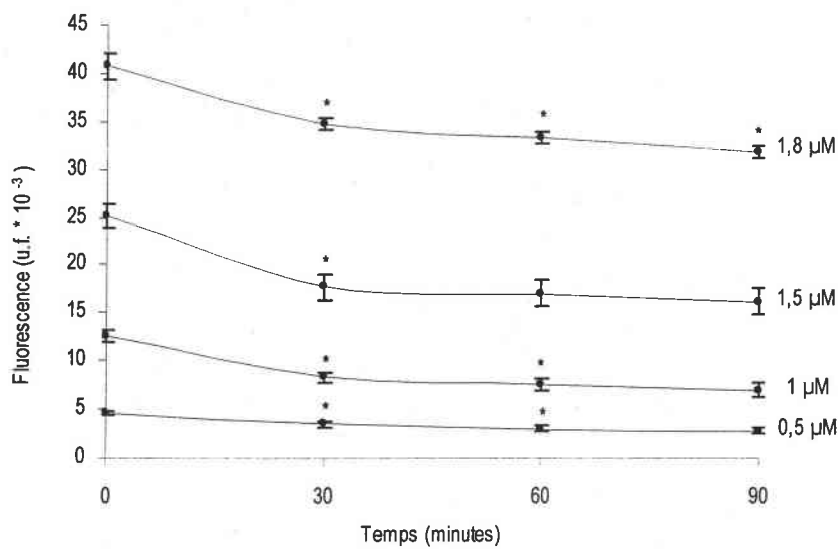
Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission ont été sélectionnées d'une part en fonction des protocoles décrits dans la littérature (Eytan *et al.*, 1997 ; Smital et Kurelec, 1997) et d'autre part en fonction des filtres disponibles dans l'appareil utilisé. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission ont respectivement été choisies à 544 et 590 nm.

Des tests ont par la suite été effectués dans le but de construire un protocole de fluorimétrie adapté à l'utilisation de la RB.

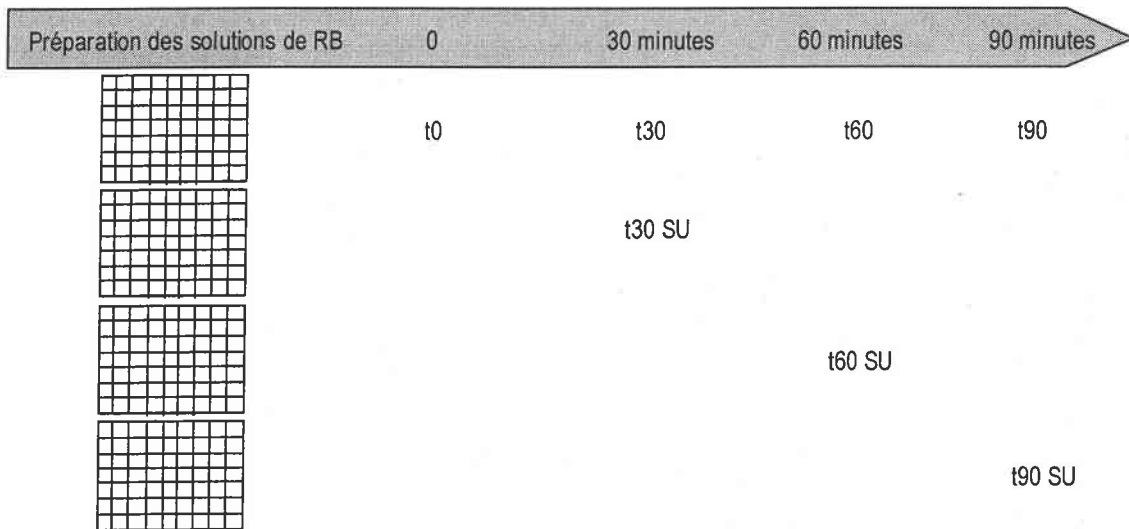
Au cours de la mesure, les molécules de RB sont excitées par des flashes lumineux émis par l'appareil. Après avoir vérifié que la modulation de ce paramètre n'influençait en rien les mesures de fluorescence effectuées dans les conditions de notre protocole, le nombre de stimulations lumineuses a été établi à 10 d'après le protocole standard proposé par l'appareil. La sensibilité du fluorimètre (exprimée en unités arbitraires) peut également être modulée en fonction de l'ordre de grandeur des concentrations de colorant à évaluer. Ainsi une faible sensibilité (30 à 50) est mieux adaptée à la mesure de fortes concentrations alors qu'il est préférable d'augmenter la sensibilité (70) pour détecter des concentrations plus faibles. A la suite de différents tests, nous avons fixé la sensibilité à 30, en regard des concentrations de RB mesurées lors de la phase d'efflux qui s'échelonnent de 0,5 à 1,8  $\mu$ M.

## C – Stabilité de la rhodamine B

La RB est un composé photosensible. Une exposition à la lumière déclenche en effet un processus de N-dééthylation qui dégrade la RB en rhodamine (Ma et Yao, 1999). Déjà évoqué dans les travaux de Smital et Kurelec (1997) et Kurelec *et al.* (2000), l'impact de ce phénomène sur la mesure de l'activité MDMX n'a pourtant jamais été quantifié. Les tests décrits ci-après ont été mis en œuvre dans le but de déterminer si le protocole de mesure de l'activité MDMX occasionnait une dégradation du colorant et, par conséquent une réduction de la fluorescence au cours du temps.



**Figure 16 :** Evolution au cours du temps (minutes) de la fluorescence (unités de fluorescence) de quatre solutions de RB (0,5 ; 1 ; 1,5 et 1,8μM). Les résultats présentés sont les moyennes et écart-types de 8 valeurs. Le symbole \* indique une différence significative entre la fluorescence mesurée au temps t considéré et celle au temps t-30 minutes ( $p < 0,05$ ).



**Figure 17 :** Protocole d'étude de l'influence des stimulations répétées sur la mesure de fluorescence de quatre solutions de RB (0,5 ; 1 ; 1,5 et 1,8μM).

Quatre microplaques ont été préparées selon le même protocole : huit répliqués de 100μL de chaque solution de RB ont été déposés sur chacune des microplaques.

La première microplaque a été lue à quatre reprises : immédiatement après sa préparation (t0), puis 30, 60 et 90 minutes après (t30, t60 et t90). Les trois autres microplaques n'ont été lues qu'à une seule reprise, respectivement après 30, 60 et 90 minutes (t30, t60 et t90 SU - stimulation unique -).

## 1 – Diminution de la fluorescence de la RB au cours du temps

Huit réplicats de 100µL de quatre solutions de RB (0,5 ; 1 ; 1,5 et 1,8µM) ont été déposés sur une microplaque. La fluorescence de ces solutions a été immédiatement évaluée en fluorimétrie (temps 0), puis les mesures ont été renouvelées après 30, 60 et 90 minutes. Entre chaque mesure, la microplaque a été conservée à température ambiante et enveloppée dans du papier aluminium afin d'éviter une exposition prolongée à la lumière. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 16.

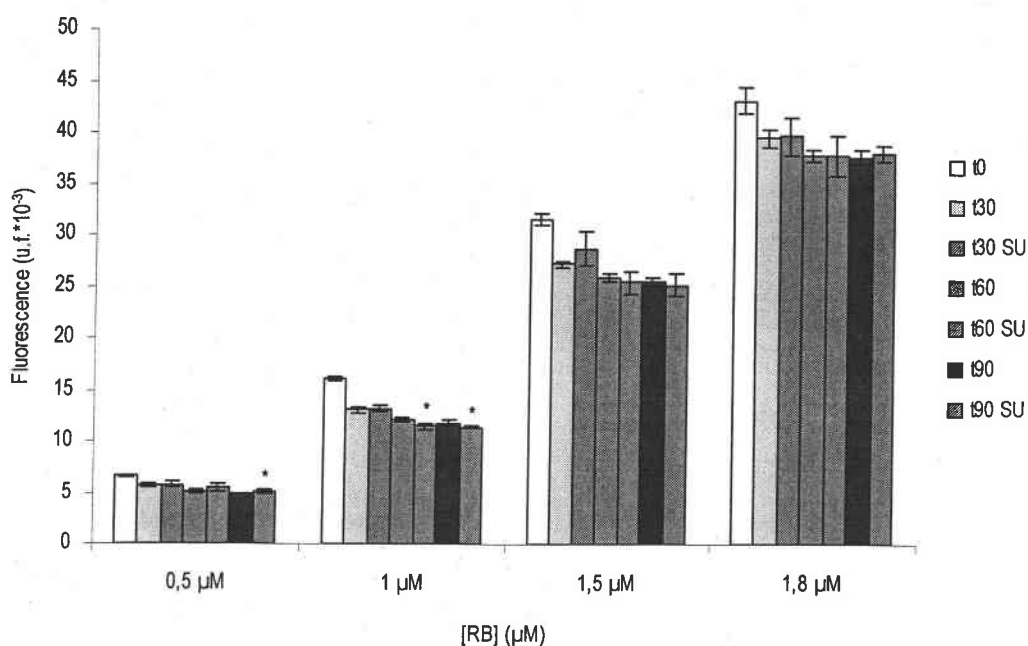
Pour chaque concentration testée, une décroissance significative de la fluorescence mesurée a été observée au cours de la première heure, excepté pour la concentration 1,5µM pour laquelle la décroissance est significative seulement au cours des 30 premières minutes. Par ailleurs, ce phénomène de diminution de la fluorescence semble être accentué pour la concentration la plus élevée (1,8µM) ; en effet la décroissance se poursuit de manière significative entre 60 et 90 minutes d'expérimentation.

L'ensemble de ces résultats montre que la fluorescence de la RB diminue au cours du temps et suggère que ce phénomène puisse occasionner un biais lors de la mesure de l'activité MDMX. Toutefois, il convient de déterminer si le phénomène observé au cours de cette expérimentation n'est pas en partie imputable au fluorimètre lui-même, dans la mesure où les échantillons de RB ont été stimulés de manière répétée par des faisceaux lumineux.

## 2 – Influence des stimulations lumineuses exercées par le fluorimètre sur la mesure de fluorescence de la RB

Afin de répondre à cette question, l'expérience précédente a été répétée en comparant la fluorescence de solutions de RB à différents temps, soit après des stimulations répétées, soit après une stimulation unique. Quatre microplaques ont été préparées de la même manière que précédemment et lues au fluorimètre selon le protocole résumé sur la figure 17.

Dans le cas de la solution à 0,5µM évaluée au temps 90 minutes, une différence significative a été observée entre la fluorescence mesurée à partir de l'échantillon stimulé



**Figure 18 :** Influence des stimulations répétées sur la fluorescence de quatre solutions de RB (0,5 ; 1 ; 1,5 et 1,8μM). Les mesures de fluorescence ont été effectuées selon le protocole décrit sur la figure 17. Les résultats présentés sont les moyennes et écart-types de 8 valeurs. Le symbole \* indique une différence significative entre les mesures répétées (bâtons d'histogramme colorés) et les mesures uniques (bâtons d'histogramme hachurés) de fluorescence effectuées à chaque temps étudié ( $p < 0,05$ ).

pour la quatrième fois et celle mesurée à partir de l'échantillon n'ayant subi qu'une stimulation (Figure 18). Le même résultat a été obtenu à la concentration  $1\mu\text{M}$  dès 60 minutes. En revanche, aucune différence significative n'a été observée aux concentrations  $1,5$  et  $1,8\mu\text{M}$  (Figure 18).

Finalement, il semble que la répétition des stimulations exercées par le fluorimètre puisse occasionner une modification de la fluorescence mesurée pour les concentrations les plus faibles. En revanche, aucun effet n'a pu être observé pour les concentrations les plus élevées.

Par ailleurs, ces résultats confirment ceux obtenus précédemment et montrent à nouveau l'existence d'une décroissance de la fluorescence au cours de la première heure (Figure 18), soulignant l'importance à accorder à ce phénomène.

### 3 – Conséquences sur le protocole de mesure

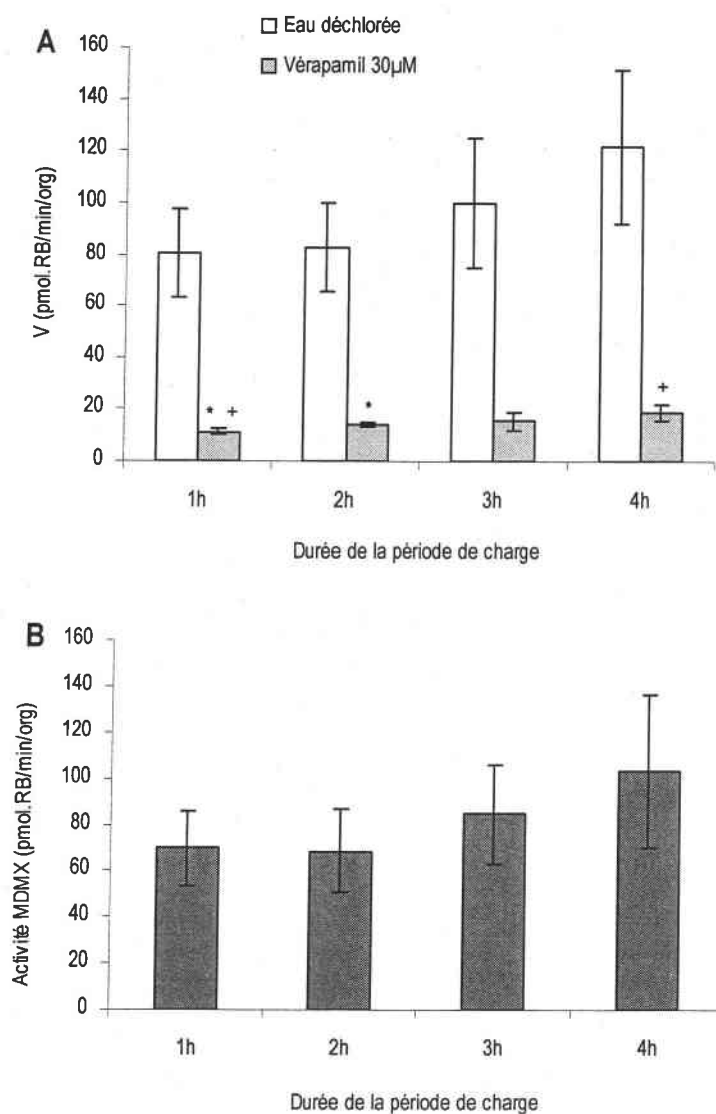
Le protocole de mesure de l'activité MDMX ne permet pas de travailler entièrement à l'obscurité. Afin de prendre en compte la diminution de la fluorescence au cours du temps, il est apparu indispensable d'effectuer une relecture de la gamme à chaque mesure de fluorescence afin de considérer les résultats obtenus pour les échantillons au temps  $t$  par rapport à la gamme lue à ce même temps  $t$ .

## II – Adaptation de la méthode d'efflux

### A – Durée de la phase de charge

Au cours de la phase de charge, les dreissènes accumulent la RB qui pénètre dans les cellules par diffusion passive. La diffusion passive étant un phénomène saturable, un équilibre existe pour lequel l'accumulation de RB sera maximale. Le protocole de mesure de l'activité MDMX proposé par Smital et Kurelec (1997) préconise un temps de charge égal à une heure. Le but de cette étude était de déterminer si la saturation du phénomène de diffusion passive est atteinte au bout d'une heure. Dans le cas où cet équilibre n'est pas





**Figure 19** : Influence de la durée de la période de charge sur la mesure de l'activité MDMX.

**A** : Evolution de l'efflux mesuré dans l'eau déchlorée et dans le vérapamil (30µM) en fonction de la durée de la période de charge. Les vitesses d'efflux obtenues en présence de vérapamil sont significativement différentes de celles obtenues en présence d'eau déchlorée ( $p < 0,05$ ). Les symboles \* et + indiquent les durées de charge pour lesquelles des différences de résultats significatives ont été obtenues.

**B** : Evolution de l'activité MDMX ( $V_{\text{eau déchlorée}} - V_{\text{vérapamil}}$ ) en fonction de la durée de la période de charge. Les différences entre les résultats obtenus suite aux quatre durées de charge testées ne sont pas significatives ( $p < 0,05$ ).

atteint, il devient envisageable d'augmenter le temps de charge afin d'amplifier la réponse du MDMX au cours de l'efflux.

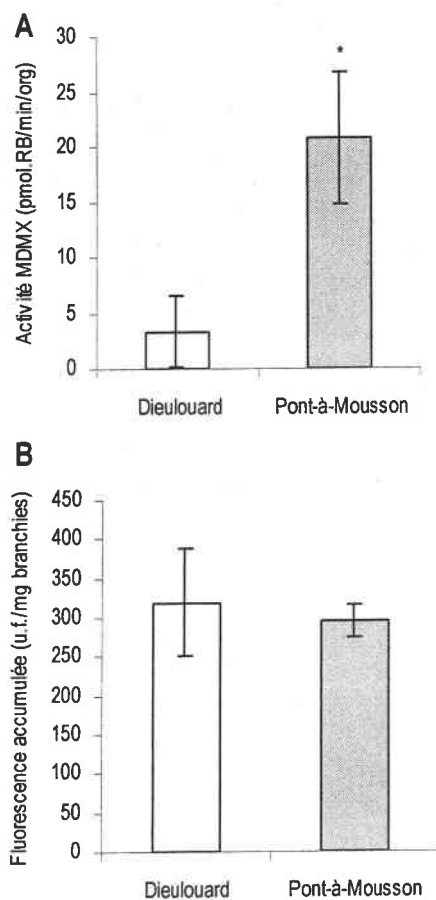
Afin de déterminer d'une part, si l'équilibre est atteint au bout d'une heure et d'autre part, d'observer l'influence de la durée de la période de charge sur les résultats obtenus pendant la phase d'efflux, l'activité MDMX a été évaluée chez douze lots de dreissènes exposées à la RB (5µM) pendant une, deux, trois ou quatre heures (3 lots par durée de charge). Les résultats présentés sur la figure 19 sont représentatifs de quatre expérimentations.

La vitesse d'efflux de la RB en présence d'eau déchlorée augmente (81 à 122 pmol.RB/min/org) lorsque la durée de la phase de charge passe de 1 à 4 heures (Figure 19-A). Cependant la différence entre les résultats obtenus pour ces quatre conditions de charge n'est pas significative. De la même manière, la vitesse d'efflux obtenue en présence de vérapamil augmente (11 à 19 pmol.RB/min/org) lorsque la durée de la période de charge est allongée (Figure 19-A). Cette fois, les résultats obtenus après 2 et 4 heures de charge sont significativement différents de ceux obtenus avec le protocole standard préconisant 1 heure de charge.

L'activité MDMX calculée à partir des vitesses d'efflux obtenues dans les deux milieux (eau déchlorée et vérapamil) est également accrue lorsque la durée de charge augmente (Figure 19-B). Cependant, la différence entre les activités mesurées après 1, 2, 3 et 4 heures de charge n'est pas significative.

L'ensemble de ces résultats montre que l'augmentation du temps de charge entraîne une augmentation significative de l'efflux non MDMX (mis en évidence par la mesure de l'efflux en présence de vérapamil). L'efflux lié au MDMX augmente également ; cette augmentation, bien que non significative permet toutefois d'amplifier le signal lors de la mesure (+20% après 4 heures de charge). Ce résultat s'est en outre répété au cours des quatre expérimentations menées.

Nous n'avons pas jugé nécessaire d'augmenter encore la durée de la période de charge dans la mesure où cela contribuerait d'une part, à alourdir la manipulation et d'autre part, à accroître la part de non spécifique. Une durée de charge de 4 heures a finalement été conservée dans la mesure où elle permet d'amplifier la réponse du MDMX tout en restant compatible avec la réalisation d'une manipulation relativement rapide.



**Figure 20 :** Activité MDMX et accumulation cellulaire de RB pendant la phase de charge.

**A :** Activité MDMX mesurée chez des dreissènes transférées pendant 2,5 mois sur deux sites naturels localisés sur le cours aval de la Moselle, Dieulouard et Pont-à-Mousson, situés respectivement en amont et en aval de l'agglomération de Pont-à-Mousson. Le symbole \* indique une différence significative entre les niveaux d'activité MDMX présentés par les dreissènes exposées in situ ( $p < 0,05$ ).

**B :** Accumulation cellulaire de RB mesurée chez des dreissènes transférées pendant 2,5 mois sur les sites décrits précédemment. La fluorescence accumulée dans les branchies de dreissènes exposées pendant une phase de charge de quatre heures à une solution de RB ( $5\mu\text{M}$ ) a été mesurée et est exprimée en unités de fluorescence par mg de branchies (u.f./mg branchies).

## B – Accumulation de RB pendant la phase de charge

Cette expérimentation visait à appuyer les travaux précédemment décrits en mettant directement en évidence l'accumulation cellulaire de RB au cours de la phase de charge. Les études réalisées dans le cadre de la résistance MDR soulignent que ce phénotype se traduit non seulement par un efflux accru des composés substrats, mais également par une accumulation réduite (Endicott et Ling, 1989 ; Gottesman et Pastan, 1993).

Les branchies étant les organes de la filtration, ces tissus sont majoritairement impliqués dans l'accumulation et le rejet de RB lors de la réalisation de la méthode d'efflux. Afin de vérifier que le niveau d'activité MDMX n'interfère pas avec l'accumulation de RB pendant la phase de charge, la quantité de RB accumulée dans les branchies de dreissènes présentant des niveaux d'activité variables a été évaluée.

Les dreissènes utilisées pour ce test ont été prélevées à La Maxe et transférées pendant 2,5 mois sur deux sites naturels localisés sur le cours aval de la Moselle, en amont (Site Dieulouard) et en aval de Pont-à-Mousson (Site Pont-à-Mousson). Ces deux sites ont été choisis en amont et en aval d'une agglomération afin de disposer d'un différentiel de qualité de l'eau engendrant des niveaux d'activité MDMX différents chez les dreissènes transférées. Les niveaux d'activité ont été contrôlés selon le protocole décrit dans le chapitre 2.2 (§ I-B).

Pour la mesure de l'accumulation cellulaire, six lots de dreissènes (3 lots par population étudiée) ont été exposés à la RB (5 $\mu$ M) durant une phase de charge de 4 heures selon le protocole défini précédemment. L'expérimentation s'est déroulée selon le protocole décrit dans le chapitre 2.2 (§ III-B). Après dissection et homogénéisation des branchies des dreissènes exposées à la RB, la fluorescence accumulée a été mesurée en fluorimétrie.

L'activité MDMX mesurée chez les organismes transférés à Pont-à-Mousson présentait un niveau 6 fois plus élevé que celle mesurée chez les organismes transférés à Dieulouard (Figure 20-A).

L'évaluation de la fluorescence accumulée dans les branchies des dreissènes montre que la quantité de RB accumulée suite à une exposition de 4 heures à 5 $\mu$ M est similaire dans les deux populations de dreissènes étudiées, bien qu'elles présentent des niveaux d'activité

MDMX significativement différents (Figure 20-B). Ce résultat confirme que la concentration de RB utilisée et le temps de charge choisis suffisent pour favoriser une accumulation équivalente chez des dreissènes présentant des niveaux d'activité MDMX variables. Ce point permet de s'assurer que la mesure de l'efflux de RB n'est pas biaisée par une accumulation différente de RB pendant la phase de charge.

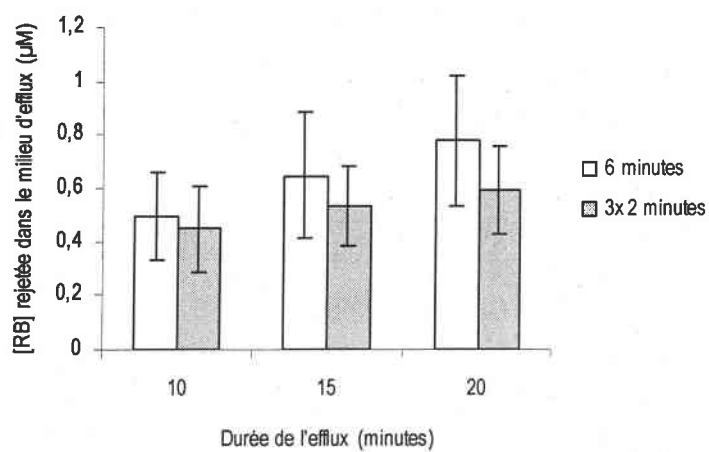
L'ensemble de ces résultats a permis non seulement de mettre en évidence l'accumulation de la RB dans les cellules branchiales, mais également de montrer que l'accumulation est similaire quelque soit le niveau d'activité mesuré. Ces travaux ont été complétés par d'autres expérimentations similaires (non présentées) basées sur la mesure de l'accumulation de RB chez des dreissènes issues de 4 populations présentant des niveaux d'activité MDMX différents (3,4 ; 20,7 ; 64,4 ; 106,7 pmol.RB/min/org). Les résultats obtenus ont permis de confirmer ceux présentés précédemment.

### **C – Influence de la RB sur l'activité mesurée**

Il a été vérifié que l'exposition à la RB pendant la phase de charge n'engendrait pas de biais dans la réponse mesurée. Une expérimentation visant à étudier le comportement de l'activité MDMX chez des organismes exposés à deux concentrations de RB a montré qu'après 24 heures d'exposition à 5 $\mu$ M, l'activité n'était pas modifiée par rapport au témoin. La phase de charge (5 $\mu$ M, 4 heures) n'engendre donc pas d'effet sur le niveau de réponse mesuré. De plus, l'exposition à 5 $\mu$ M de RB n'a provoqué ni mortalité, ni altération du comportement de fixation des dreissènes. Ces observations confirment que la période de charge ne constitue pas un stress excessif pour les organismes. L'ensemble des résultats concernant cette expérimentation est présenté dans le chapitre 3.3 (§ I-A) de ce document.

### **D – Lavages**

Le protocole proposé par Smital et Kurelec en 1997 préconise la réalisation d'une étape de lavage des dreissènes entre les étapes de charge et d'efflux, ceci afin de limiter le bruit de fond en éliminant le colorant absorbé sur les coquilles et dans le manteau des organismes. La durée de cette étape a été estimée à 5 minutes. Afin de s'assurer de l'efficacité du lavage, nous avons augmenté ce temps à 6 minutes et comparé le bruit de



**Figure 21 :** Evaluation de l'efficacité de l'étape de lavage : comparaison du bruit de fond obtenu pendant la phase d'efflux après un lavage de 6 minutes et après 3 lavages de 2 minutes.

fond obtenu en réalisant un bain de 6 minutes avec celui obtenu en réalisant trois bains successifs de 2 minutes.

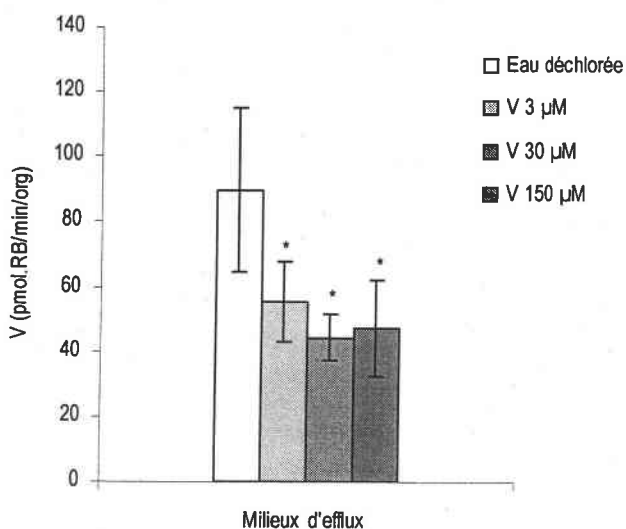
Dans ce but, six lots de dreissènes ont été exposés à la RB ( $5\mu\text{M}$ ) pendant une phase de charge de 1 heure (ce test a été réalisé avec le protocole initial prévoyant une heure de charge). Trois lots ont ensuite subi un lavage de 6 minutes pendant que les trois autres lots ont été lavés dans trois bains successifs de 2 minutes chacun. Chaque lot de dreissènes a ensuite été remplacé dans 30 mL d'eau déchlorée pour la phase d'efflux. Les mesures de la fluorescence rejetée dans le milieu ont été effectuées après 10, 15 et 20 minutes d'efflux.

Les résultats obtenus, présentés sur la figure 21, ne montrent aucune différence significative entre les concentrations de RB rejetée dans le milieu d'efflux après les deux modalités de lavages testées. Le bruit de fond obtenu pendant l'efflux est toutefois réduit après trois lavages courts par rapport à celui obtenu après un lavage unique plus long. Par souci de réduire au maximum le rejet non spécifique et dans la mesure où il s'est avéré que la durée de la charge a été par la suite augmentée à quatre heures (ce chapitre, § II-A), nous avons choisi de réaliser l'étape de lavage en 3 bains de 2 minutes chacun.

## **E – Inhibition de l'efflux par le vérapamil**

### **1 – Influence du vérapamil sur la fluorescence de la RB**

Le vérapamil est un inhibiteur couramment utilisé pour évaluer l'activité MDMX. Avant d'utiliser ce composé pour nos expérimentations, nous avons vérifié qu'il ne présente aucune propriété de fluorescence et qu'il ne modifie pas celle de la RB. Pour cela, la fluorescence de différentes solutions de vérapamil, ainsi que d'un mélange RB/vérapamil a été mesurée. Aucun effet dû à sa présence n'a été observé (résultats non présentés).



**Figure 22 : Effet inhibiteur du vérapamil.**

Quatre lots de dreissènes ont été exposés à la RB (5µM) pendant une phase de charge de 4 heures, puis ont été lavés dans 3 bains d'eau déchlorée de 2 minutes. Au cours de l'efflux, chacun des quatre lots a été placé soit dans l'eau déchlorée, soit dans une des trois solutions de vérapamil à tester (3, 30 et 150µM). Les résultats présentés sont les moyennes et écart-types des valeurs obtenues au cours de quatre expérimentations consécutives effectuées avec les mêmes lots de dreissènes. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les vitesses d'efflux obtenues en présence des trois concentrations de vérapamil testées. Le symbole \* indique une inhibition significative de l'efflux en présence de vérapamil par rapport à l'efflux évalué en son absence ( $p < 0,05$ ).

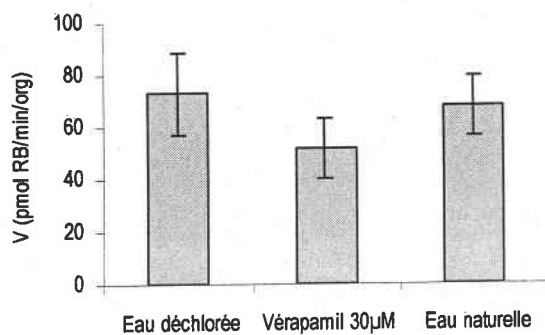


## 2 – Choix de la concentration en vérapamil

Des travaux antérieurs ont montré que le vérapamil exerce un effet inhibiteur proportionnel à la concentration appliquée sur une gamme allant de 1 à 30  $\mu\text{M}$  (Smital et Kurelec, 1997). Sur la base de ces résultats, l'effet inhibiteur du vérapamil sur la cinétique d'efflux de la RB a été mesuré afin de choisir la concentration la mieux adaptée à l'évaluation de l'activité MDMX par la méthode d'efflux. Deux concentrations entrant dans la gamme précédemment citée (3 et 30  $\mu\text{M}$ ), ainsi qu'une concentration largement supérieure ont été choisies afin de déterminer si les résultats obtenus par Smital et Kurelec (1997) se vérifiaient dans notre cas.

Quatre lots de dreissènes ont été exposés à une solution de RB (5  $\mu\text{M}$ ) pendant une phase de charge de 4 heures, puis ont été lavés selon le protocole décrit précédemment (3 bains de 2 minutes). Au cours de l'efflux, chacun des quatre lots a été placé soit dans l'eau déchlorée, soit dans une des trois solutions de vérapamil à tester (3, 30 et 150  $\mu\text{M}$ ). La figure 22 présente les moyennes et écart-types des résultats de quatre expérimentations consécutives effectuées avec les mêmes dreissènes.

La présence de vérapamil dans le milieu d'efflux engendre une réduction du rejet de RB, et ce, aux trois concentrations testées. En effet, les vitesses d'efflux obtenues en présence de vérapamil sont significativement différentes de celle obtenue en présence d'eau. Cependant, les effets exercés par les trois concentrations testées ne sont pas significativement différents les uns des autres. A 3  $\mu\text{M}$ , le vérapamil exerce un effet inhibiteur sur le rejet, mais il n'est que faiblement significatif par rapport à l'eau déchlorée ( $p=0,046$ ). Cette concentration pourrait donc s'avérer être insuffisante pour inhiber correctement l'activité MDMX au cours du dosage. A 30  $\mu\text{M}$ , l'inhibition est du même ordre, mais la significativité de cette inhibition est plus importante ( $p=0,014$ ). L'inhibition exercée par le vérapamil à 150  $\mu\text{M}$  ( $p=0,024$ ) reste similaire à celle exercée par les concentrations plus faibles. Par conséquent, augmenter la concentration en vérapamil au delà de 30  $\mu\text{M}$  est apparu inutile dans la mesure où l'inhibition semble maximale à cette dose. Parmi celles testées, la concentration de 30  $\mu\text{M}$  semble donc la mieux adaptée à la mesure de l'activité MDMX chez la dreissène. Cette concentration permet d'obtenir une inhibition maximale de l'efflux, tout en limitant les problèmes de toxicité qui pourraient survenir en utilisant des concentrations plus élevées.



**Figure 23 :** Vitesse d'efflux de la RB en présence d'eau déchlorée, de vérapamil (30µM) et d'une eau naturelle. Chacun des trois milieux a été testé sur des lots d'organismes différents le même jour.

Nos résultats n'ont pas reproduit la relation linéaire entre concentration appliquée et effet inhibiteur mesuré pour les deux concentrations testées dans la gamme 1-30 $\mu$ M définie par Smital et Kurelec (1997). Toutefois, le résultat obtenu à 150 $\mu$ M conforte l'hypothèse selon laquelle la relation ne peut être linéaire au delà de 30 $\mu$ M, dans la mesure où les capacités du système MDMX à prendre en charge le vérapamil sont saturées. Il faut en outre souligner qu'il nous a été impossible d'obtenir une inhibition totale de l'efflux de RB, même à des concentrations de l'ordre de 300 $\mu$ M, que nous avons auparavant testées au cours d'autres expérimentations non présentées dans ce document. Cette remarque rappelle que le système MDMX n'est pas le seul intervenant dans les processus d'élimination cellulaire de la RB au cours de l'efflux.

### III – Aménagement du protocole

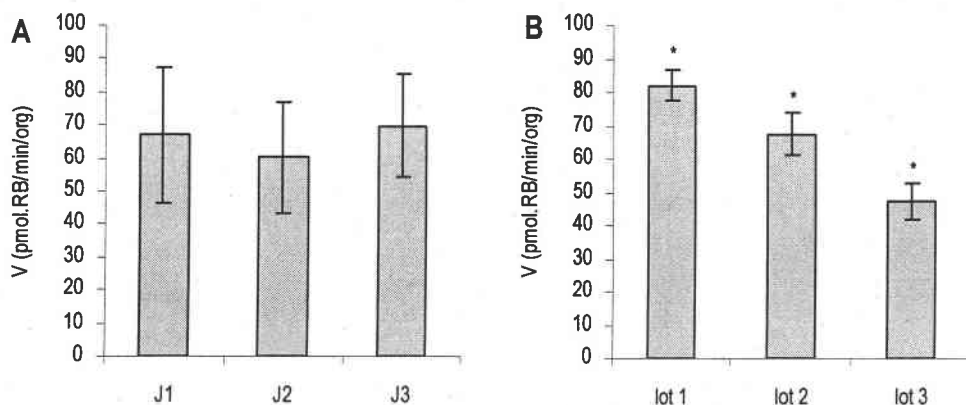
Etant donné que l'utilisation d'organismes vivants génère une variabilité liée à l'état physiologique des organismes, ainsi qu'au stress généré par leur manipulation, nous avons réfléchi aux moyens d'aménager le protocole afin de réduire cette variabilité ou tout au moins de la contrôler au mieux.

#### A – Variabilité interlot

Une expérimentation visant à mesurer l'impact d'une eau naturelle sur l'efflux de RB a été effectuée en triplicats (chapitre 2.2 § II-B-3) dans les trois milieux suivants (3 lots de dreissènes par milieu) :

- eau naturelle à tester
- eau déchlorée et vérapamil (30 $\mu$ M), qui constituent les milieux témoins.

Les résultats présentés sur la figure 23 sont les moyennes et écart-types des vitesses d'efflux obtenues dans chacun des trois milieux. Le vérapamil semble exercer un effet inhibiteur sur l'activité d'efflux dans la mesure où la vitesse d'efflux de RB est réduite par rapport à celle observée en présence d'eau déchlorée. En revanche, l'eau naturelle ne



**Figure 24 :** Vitesse d'efflux de la RB en présence d'eau déchlorée. Trois mesures identiques ont été effectuées trois jours consécutifs avec les mêmes lots d'organismes.

**A :** Variabilité intermesure ; les résultats présentés pour chaque jour de mesure (J1, J2 et J3) sont les moyennes et écart-types des valeurs obtenues pour trois lots d'organismes.

**B :** Variabilité interlot ; les résultats présentés pour chaque lot (lots 1, 2, 3) sont les moyennes et écart-types des vitesses d'efflux obtenues au cours des trois mesures consécutives. Le symbole \* indique une différence significative entre les résultats obtenus pour chaque lot.

semble exercer aucun effet sur l'efflux. Malgré les tendances dégagées, les résultats obtenus dans les trois milieux ne sont pas significativement différents au regard des écart-types calculés pour chaque triplicat.

Le vérapamil exerçant habituellement un effet inhibiteur significatif, nous nous sommes interrogés sur la possibilité qu'une variabilité interlot importante puisse masquer les effets recherchés. En effet, les milieux ont été testés avec des lots d'organismes différents. Dans la mesure où il est difficile de contrôler la filtration des organismes, il est possible que les résultats soient biaisés par des variations d'état physiologique et donc de filtration d'un lot à l'autre, ce qui pourrait expliquer que la différence entre l'eau et le vérapamil soit atténuée.

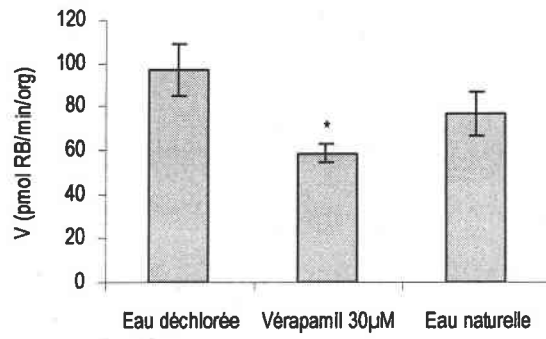
Dans la mesure où l'existence d'une variabilité interlot importante pourrait gêner l'exploitation des résultats, il était nécessaire de limiter autant que possible cette source de variabilité de la réponse. Dans cette optique, il a semblé plus intéressant de tester les trois milieux avec les mêmes lots d'organismes. Ceci suppose que les mesures dans les trois milieux soient réalisées séparément, en effectuant un dosage par milieu et par jour de manière à laisser les organismes dépurer entre chaque mesure.

Ce type de protocole étant cependant susceptible d'introduire une nouvelle source de variabilité liée à la réalisation des dosages sur plusieurs jours, il est donc apparu nécessaire d'évaluer la réponse d'un même lot d'organismes sur plusieurs jours consécutifs.

## B – Variabilité intermesure

Trois mesures identiques ont été réalisées sur trois jours consécutifs (J1, J2, J3), en conservant les mêmes lots d'organismes. L'efflux a été effectué en présence d'eau déchlorée.

Les résultats présentés sur la figure 24-A sont les moyennes et écart-types des vitesses d'efflux obtenues pour chaque mesure. Les vitesses d'efflux obtenues en présence d'eau déchlorée sont toutes similaires, quelque soit le jour où est effectuée la mesure. Les écart-types calculés sont assez élevés, mais s'expliquent par le fait que les trois lots composant le triplicat ont présenté des réponses différentes. En effet, la figure 24-B montre que les vitesses d'efflux présentées par les trois lots sont significativement différentes. Cependant, les variations de réponse d'un lot à l'autre sont reproductibles d'un jour à l'autre. Par conséquent, on peut considérer que les organismes répondent *a priori* toujours de la même



**Figure 25 :** Vitesse d'efflux de la RB en présence d'eau déchlorée, de vérapamil (30  $\mu$ M) et d'une eau naturelle. Chacun des trois milieux a été testé sur les mêmes lots d'organismes au cours de mesures réalisées sur trois jours consécutifs.

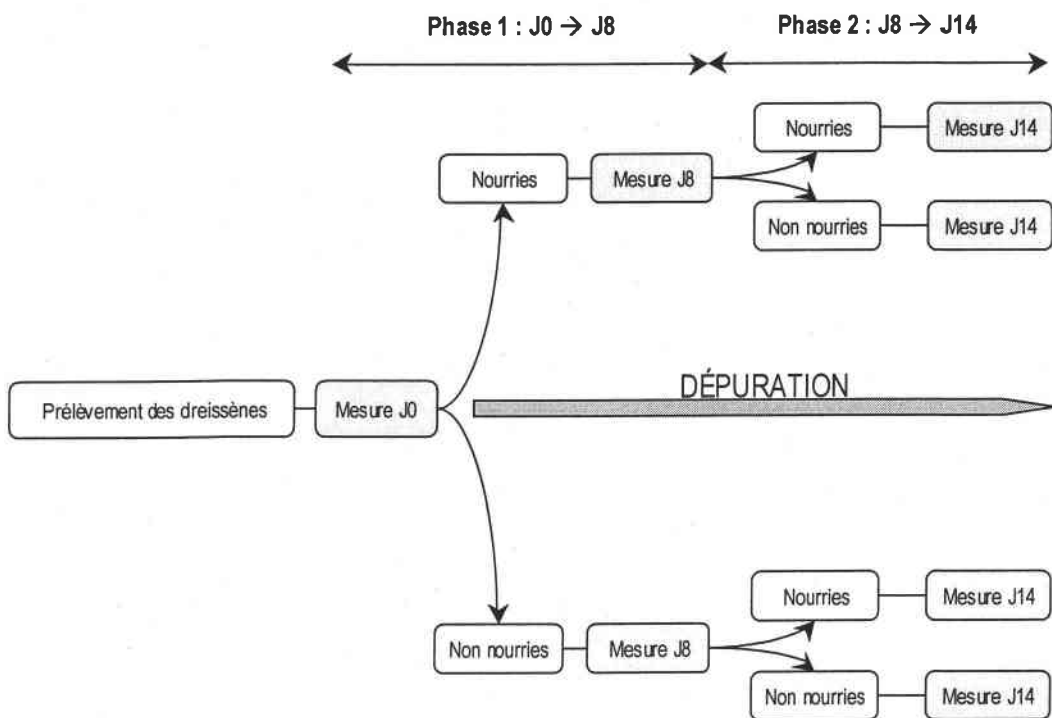
manière sur une période de trois jours dans la mesure où les conditions sont identiques. En complément, on peut signaler qu'une expérimentation testant la réponse des mêmes organismes sur quatre jours a été effectuée (ce chapitre, § II-E-2). Ce protocole n'ayant été testé qu'à une reprise et étant donné que les résultats obtenus sur trois jours sont tout à fait satisfaisants, nous avons choisi de ne pas renouveler l'utilisation de protocoles impliquant les mêmes organismes sur plus de trois jours.

### **C – Limitation des sources de variation**

En se basant sur les résultats précédents, nous avons renouvelé l'expérimentation présentée dans ce chapitre au § III-A en modifiant le protocole de manière à effectuer la mesure de l'impact des trois milieux sur trois jours consécutifs en conservant les mêmes lots d'organismes.

Les résultats présentés sur la figure 25 sont les moyennes et écart-types des vitesses d'efflux obtenues dans chacun des milieux. Cette fois, l'effet inhibiteur exercé par le vérapamil s'est avéré significatif. En revanche, l'eau naturelle testée n'exerce pas d'effet inhibiteur sur le rejet de RB pendant la phase d'efflux.

L'ensemble de ces travaux montre qu'il est préférable d'utiliser les mêmes lots d'organismes pour tester plusieurs réponses à comparer afin de limiter la variabilité des résultats. Sur cette base, les protocoles de mesure de l'activité MDMX et du potentiel inhibiteur ont été adaptés pour favoriser l'obtention de résultats fiables et reproductibles (Chapitre 2.2 § II).



**Figure 26** : Déroulement de l'expérimentation visant à déterminer l'influence de l'apport en nourriture sur le profil de dépuración en laboratoire de l'activité MDMX.

Après prélèvement et mesure de l'activité initiale (J0), les dreissènes ont été réparties en deux lots placés en eau déchlorée additionnée ou non de nourriture. Le niveau de l'activité MDMX a été contrôlé après cette première phase de 8 jours (J8) de dépuración. Pour la deuxième phase, chacun des deux lots de dreissènes a de nouveau été divisé en deux groupes, l'un nourri, l'autre non. Le niveau d'activité MDMX a ensuite été contrôlé après 6 jours dans ces nouvelles conditions, soit après 14 jours de dépuración au total (J14).



## Chapitre 3.2 : Dépuration de l'activité MDMX et activité basale

Les expérimentations visant à exposer les organismes à différents stress sont précédées d'une période de dépuration de l'activité MDMX en laboratoire.

Ce chapitre résume dans un premier temps les résultats concernant l'impact de deux facteurs (nourriture et température) sur l'efficacité du processus de dépuration. Dans un deuxième temps, les résultats obtenus au cours des différentes étapes de dépuration effectuées au cours de cette thèse seront rassemblés afin de montrer l'intérêt d'une telle démarche.

### I – Influence de la nourriture sur le processus de dépuration

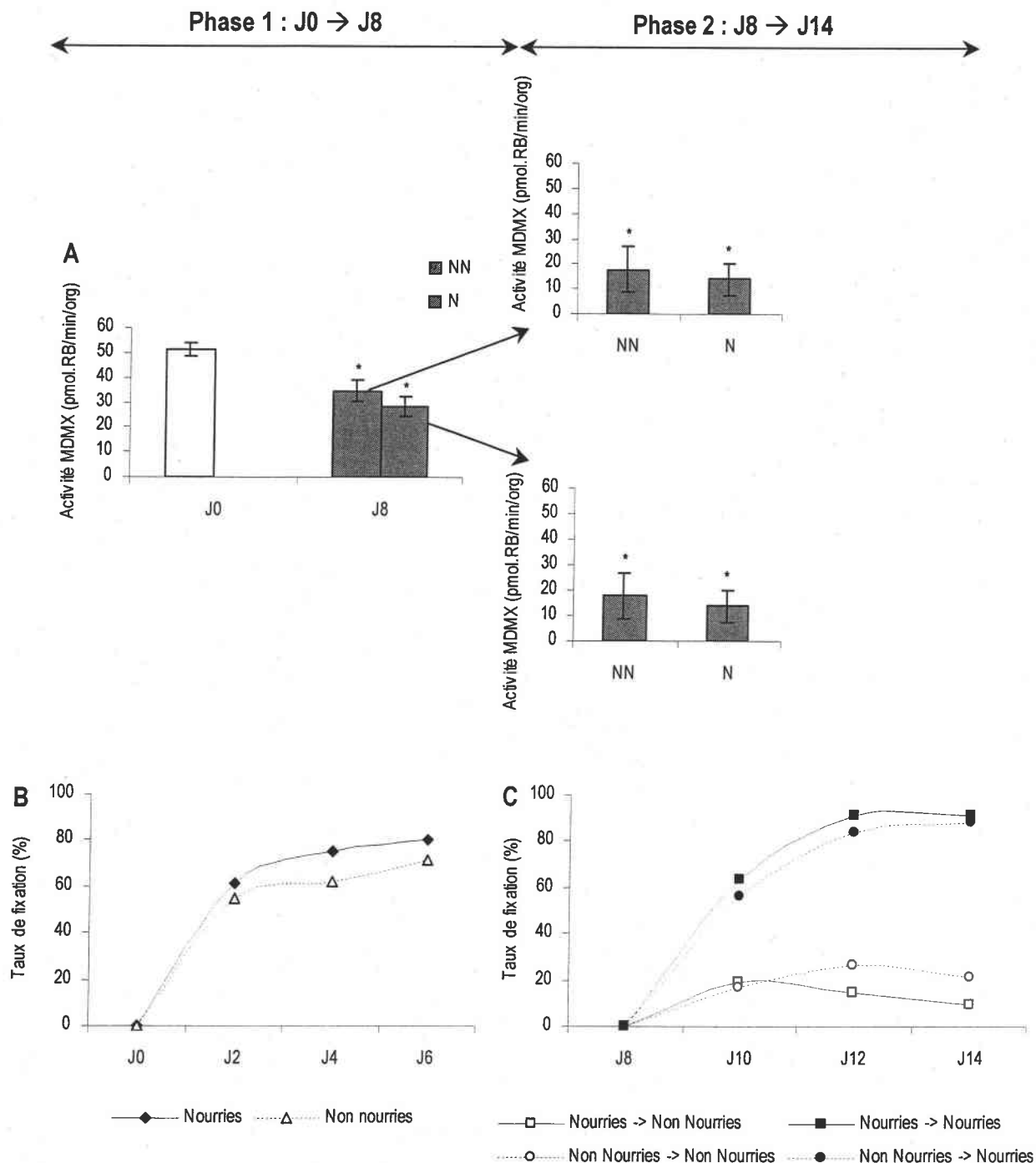
#### A - Objectifs

L'objectif de ce travail était de comparer les profils de dépuration obtenus en présence ou en absence de nourriture afin de déterminer l'éventuel impact de ce paramètre sur l'activité mesurée. Dans ce but, l'activité MDMX a été suivie chez des dreissènes nourries ou non, ainsi que chez des dreissènes soumises à une alternance présence / absence de nourriture. En parallèle, l'évolution du comportement de fixation des dreissènes au substrat dans les différents milieux testés a été suivie afin de constituer un témoin de condition physiologique des organismes.

#### B – Suivi de la dépuration

##### 1 – Activité MDMX

Le niveau initial de l'activité MDMX présenté par les dreissènes a été contrôlé le lendemain du prélèvement (J0). Les dreissènes prélevées ont ensuite été réparties en deux



**Figure 27 :** Influence de l'apport de nourriture sur la dépuración de l'activité MDMX.

**A** – Après contrôle du niveau d'activité MDMX initial (J0), la dépuración a été évaluée après 8 et 14 jours (J8 et J14) chez des dreissènes placées en eau déchlorée additionnée (N) ou non (NN) de nourriture selon le protocole décrit sur la figure 26. Le symbole \* indique une dépuración significative de l'activité par rapport à celle mesurée à la date précédente pour chaque lot testé ( $p < 0,05$ ).

**B - C** – Le taux de fixation\* des dreissènes a été contrôlé tous les deux jours au cours de la première (B) et de la seconde (C) phase de dépuración (la légende précise le groupe d'origine des dreissènes, Nourries ou Non nourries, puis la condition à laquelle elles ont été exposées pendant la seconde phase de dépuración).

\* L'expérimentation ayant été effectuée en préparant un milieu d'exposition par condition à tester, l'évaluation du taux de fixation des dreissènes n'a pu être réalisée en triplicats, d'où l'absence de barres d'erreur.

lots placés en eau déchlorée additionnée ou non de nourriture (5L d'eau déchlorée  $\pm$  1 cube de nourriture congelée pour invertébrés aquatiques). Le niveau de l'activité MDMX a été contrôlé après 8 jours (J8) de dépuración dans ces conditions. A cette date, chacun des deux lots de dreissènes a de nouveau été divisé en deux groupes, l'un nourri, l'autre non. Le niveau d'activité MDMX a été contrôlé après 6 jours dans ces nouvelles conditions, soit après 14 jours de dépuración au total (J14) (Figure 26).

Le niveau initial de l'activité MDMX mesuré après prélèvement des dreissènes atteignait 51 pmol.RB/min/org (Figure 27-A). La mesure effectuée à J8 montre une dépuración significative de cette activité, aussi bien dans le lot de dreissènes nourries, que dans le lot non nourri. Les niveaux atteints sont similaires dans les deux lots. Au cours de la deuxième phase, la dépuración s'est poursuivie et la mesure effectuée à J14 ne montre aucune différence de réaction de l'activité en fonction des quatre conditions de nourriture testées (Figure 27-A).

## 2 – Taux de fixation des dreissènes au substrat

En parallèle à la mesure de l'activité MDMX, le taux de fixation des dreissènes au support disponible a été contrôlé tous les deux jours à l'occasion des renouvellements de milieux. A la date J8 (date de la mesure de l'activité MDMX), toutes les dreissènes ont été détachées de leur substrat afin d'être replacées dans leur nouveau milieu et de permettre l'évaluation de la cinétique de fixation dans ces nouvelles conditions. Aucune mortalité n'a été enregistrée pendant toute l'expérimentation.

Au cours de la première phase de dépuración, le taux de fixation des dreissènes suit le même profil dans les deux milieux testés, mais il est resté plus faible dans le milieu sans apport de nourriture (Figure 27-B). En effet, le taux de fixation évalué dans le lot non nourri est de 55% après deux jours et atteint 71% en 6 jours. Dans le lot nourri, le taux de fixation s'est échelonné entre 62 et 80% à ces mêmes dates.

Au cours de la seconde phase, les lots nourris présentent une cinétique de fixation similaire, qu'ils aient été nourris ou non au cours de la première phase (Figure 27-C). Le taux de fixation dans ces lots atteint une valeur proche de 90% à J14. En revanche, le

processus de fixation est perturbé dans les lots non nourris au cours de cette deuxième phase, qu'ils aient été nourris ou non au cours de la première phase. En effet le taux de fixation évalué dans ces lots s'est avéré particulièrement faible (10 à 20%).

## C – Bilan

La présence ou l'absence de nourriture n'a eu aucune incidence sur l'activité MDMX mesurée chez les dreissènes. En effet, les résultats n'ont montré aucune différence significative entre les activités évaluées chez les différents lots testés, même chez les lots non nourris qui semblaient pourtant relativement perturbés au regard du comportement de fixation particulièrement altéré chez ces organismes. De la même manière, l'alternance présence / absence de nourriture n'a exercé aucun effet visible sur l'activité MDMX. En revanche, elle provoque systématiquement une altération du comportement de fixation dans le cas de la suppression de l'apport de nourriture, et, au contraire, une récupération dans le cas où la nourriture est additionnée au milieu.

Cette expérimentation a finalement permis de montrer que l'apport de nourriture ne perturbe en aucun cas la dépuration des organismes en laboratoire. En revanche, si l'absence de nourriture ne semble pas influencer de manière directe la réponse de l'activité MDMX, la physiologie des organismes semble considérablement affectée. Par conséquent, les périodes de dépuration effectuées au laboratoire au cours de ces travaux ont toutes été réalisées en milieu additionné de nourriture.

### Résumé

- La dépuration de l'activité MDMX s'est avérée significative aussi bien en présence qu'en absence de nourriture.
- La réponse de l'activité MDMX s'est avérée similaire que ce soit en présence ou en absence de nourriture.
- Le processus de fixation des dreissènes a été perturbé en absence de nourriture.

## II – Influence de la température sur le processus de dépuration

### A – Objectifs

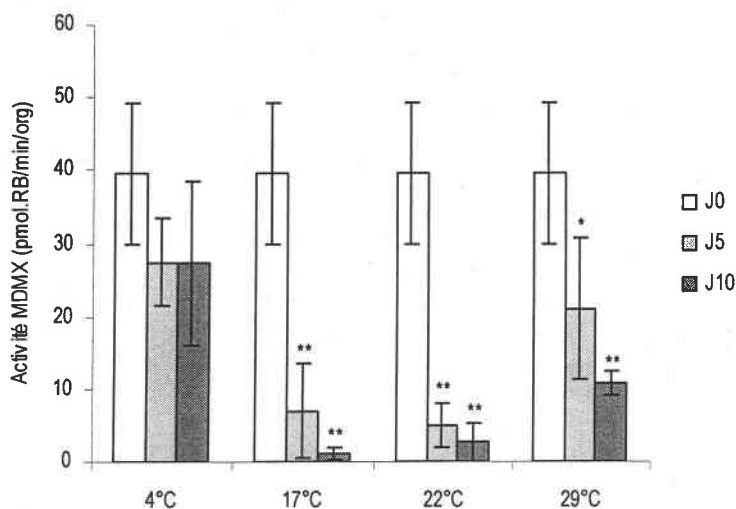
Des suivis annuels de l'activité MDMX chez des bivalves marins prélevés tous les mois sur des sites naturels ont montré que l'activité présentait un cycle saisonnier et augmentait en été et en automne (Minier *et al.*, 2000 ; Keppler et Ringwood, 2001a, b). Cette induction de l'activité était corrélée à l'augmentation de la température. Ces hypothèses émises à partir d'observations *in situ* ont été confirmées par des travaux en laboratoire montrant l'induction du MDMX chez des moules marines exposées à des chocs thermiques (Eufemia et Epel, 2000). En s'appuyant sur ces travaux, nous avons testé en laboratoire l'effet de ce paramètre sur la dépuration de l'activité.

Quatre températures ont été choisies en fonction des valeurs habituellement enregistrées dans la Moselle. Ainsi des températures voisines de 4 et 22°C sont relevées respectivement pendant les périodes hivernale et estivale. Une température extrême voisine de 29°C a également été testée. Le milieu témoin a été maintenu à 17°C qui est la température habituellement utilisée dans la salle d'élevage du laboratoire et qui correspond à des valeurs printanières ou automnales dans le milieu naturel.

### B – Suivi de la dépuration

#### 1 – Activité MDMX

Les dreissènes ont été prélevées dans la Moselle à La Maxe alors que la température de l'eau avoisinait 22-23°C. Le niveau initial de l'activité MDMX présenté par les dreissènes a été contrôlé le lendemain du prélèvement (J0). Les dreissènes ont ensuite été réparties en quatre lots de 20 à 35 dreissènes (5L d'eau déchlorée additionnée d'un cube de nourriture congelée pour invertébrés aquatiques) et acclimatées aux quatre températures à tester. La température de 4°C a été maintenue en plaçant le bac d'exposition en chambre froide. La température témoin de 17°C est constamment maintenue dans la salle d'élevage. Les milieux à 22 et 29°C ont été chauffés à l'aide d'une résistance pour aquarium. Une



**Figure 28 :** Evolution de l'activité MDMX en fonction de la température du milieu.

Dépuration de l'activité MDMX chez des dreissenés prélevées à la Maxe puis placées en eau déchlorée pendant 5 et 10 jours (J5 et J10) à 4, 17, 22 et 29°C. Le symbole \* indique une dépuration significative par rapport à l'activité initiale évaluée à J0 (\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,002$ ).

**Tableau X :** Comparaison des résultats obtenus après 5 (J5) et 10 (J10) jours d'exposition aux quatre températures testées (4, 17, 22 et 29°C). Les différences ont été testées à l'aide du test t (3 échantillons par groupe,  $\alpha = 0,05$ ).  $p < 0,05$  indique une différence significative ; NS indique une différence non significative).

J5	4°C	17°C	22°C	29°C
4°C	X	X	X	X
17°C	$p < 0,05$	X	X	X
22°C	$p < 0,05$	NS	X	X
29°C	NS	NS	NS	X

J10	4°C	17°C	22°C	29°C
4°C	X	X	X	X
17°C	$p < 0,05$	X	X	X
22°C	$p < 0,05$	NS	X	X
29°C	NS	$p < 0,05$	$p < 0,05$	X

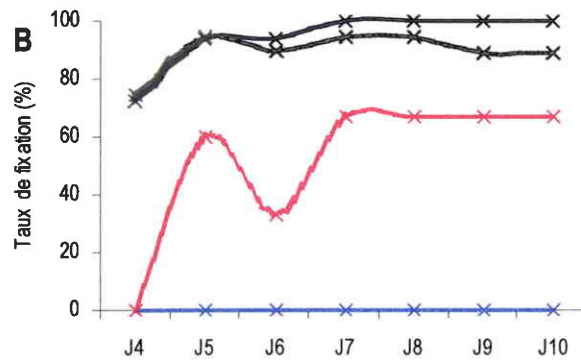
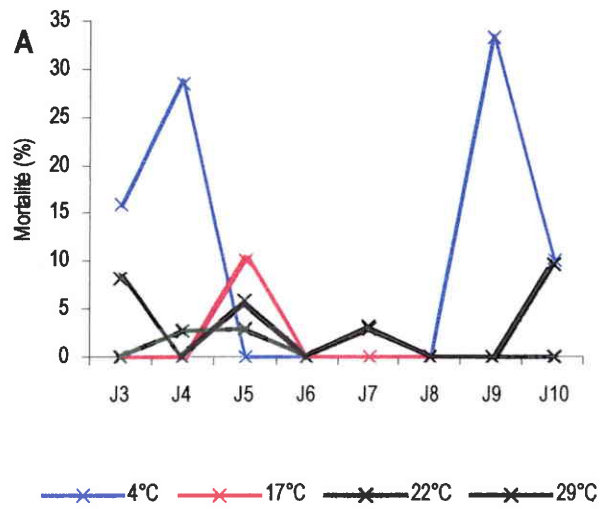
photopériode correspondant à 14 heures d'illumination par jour a été maintenue pendant l'expérimentation.

Les températures d'exposition ont été contrôlées tout au long de l'expérimentation et les valeurs moyennes enregistrées, ainsi que les écart-types correspondants sont précisés ci-après :

Lot 4°C	4,21 ± 0,54°C
Lot 17°C	16,67 ± 0,39°C
Lot 22°C	22,15 ± 0,72°C
Lot 29°C	28,83 ± 0,36°C

Le niveau de l'activité MDMX a été contrôlé après 5 et 10 jours de dépuration dans ces conditions. Les mêmes lots d'organismes (3 lots de 5 dreissènes par milieu testé) ont été utilisés pour les mesures à toutes les dates. Le cas échéant, les organismes morts au cours de l'exposition ont été remplacés par d'autres organismes exposés aux mêmes conditions. Les milieux ont été renouvelés tous les 2 jours pendant toute la durée de l'expérimentation.

Le profil de dépuration de l'activité MDMX mesurée chez les dreissènes exposées à 17°C correspond aux profils habituellement obtenus dans ces conditions. Les résultats obtenus montrent en effet une diminution significative de l'activité dès 5 jours (Figure 28). Après 10 jours, l'activité s'est stabilisée. Un profil identique a été obtenu chez les dreissènes exposées à 22°C. L'activité mesurée chez les dreissènes exposées à une température de 29°C tend également à diminuer au cours du temps. Après 5 jours, la dépuration est significative, mais le niveau d'activité s'est ensuite stabilisé à un niveau plus élevé que celui obtenu dans les milieux à 17 et 22°C. A 4°C, le profil de dépuration est perturbé par rapport au profil témoin. En effet, l'activité diminue légèrement après 5 jours, mais de manière non significative. Entre 5 et 10 jours d'exposition, le niveau s'est stabilisé à une valeur 3 à 25 fois plus élevée que celles évaluées dans les trois autres milieux (Figure 28).



**Figure 29 :** Evolution du taux de mortalité de J3 à J10 (**A**) et du taux de fixation de J4 à J10 (**B**) chez les dreissènes exposées aux températures 4, 17, 22 et 29°C.



## 2 – Mortalité et Fixation

Parallèlement à la mesure de l'activité MDMX, la mortalité et le taux de fixation des dreissènes exposées ont été contrôlés à plusieurs reprises pendant la période d'exposition.

Dans le milieu exposé à 17°C, aucune mortalité n'a été observée pendant l'expérimentation, excepté à 5 jours (Figure 29-A). A cette température, les dreissènes se sont fixées progressivement au substrat et le taux de fixation s'est stabilisé à 70% à partir de 7 jours (Figure 29-B). A 22°C une mortalité de 3% est observée les jours 4, 5 et 7. Le taux de fixation des dreissènes sur le substrat atteint 90% en 7 jours et se stabilise ensuite à cette valeur. A 29°C, on a mesuré un taux de fixation proche de 100% à partir du 7<sup>ème</sup> jour d'exposition ; cependant, une mortalité s'échelonnant entre 4 et 10% est observée tout au long de l'exposition (mortalité cumulée : 23,6%). A 4°C, trois pics de mortalité ont été observés aux jours 3 (15%), 4 (30%) et 9 (33%) (mortalité cumulée : 64%). Le taux de fixation est resté nul tout au long de l'exposition puisqu'aucune dreissène ne s'est attachée au substrat disponible dans les bacs d'exposition.

## C – Bilan

La température « témoin » est celle habituellement utilisée dans la salle d'élevage (17°C). A cette température, l'activité MDMX présente généralement une diminution progressive jusqu'à son niveau basal, qu'elle atteint généralement entre 5 et 10 jours. Les résultats obtenus ici confirment d'une part, cette cinétique de dépuration et montrent d'autre part, qu'une augmentation de la température jusqu'à plus de 22°C ne perturbe ni les niveaux d'activité MDMX, ni le processus de dépuration.

En revanche, l'exposition à la température la plus élevée, proche de 29°C, a probablement perturbé le processus de dépuration de l'activité MDMX. Il semble en effet que le profil obtenu traduise une dépuration plus lente et incomplète puisque le niveau basal n'est jamais atteint.

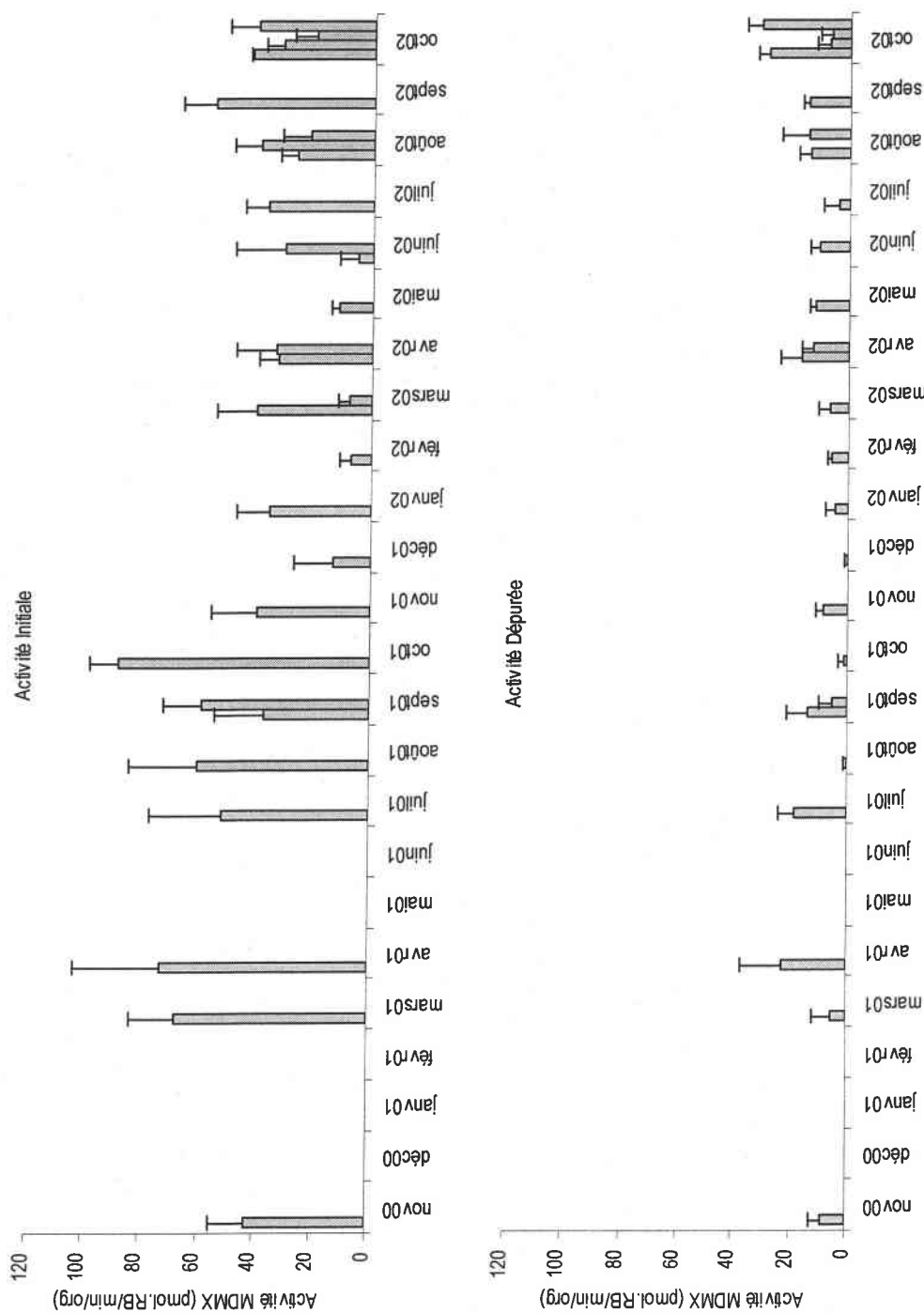
Les résultats obtenus suite à l'exposition des dreissènes à 4°C montrent un comportement atypique de l'activité MDMX. En effet, l'activité ne décroît que très légèrement et se stabilise à un niveau beaucoup plus élevé que celui évalué dans le milieu témoin. Cependant, l'hypothèse selon laquelle ce résultat soit une conséquence indirecte de

l'exposition ne peut être exclue. En effet, la réduction du taux de filtration des organismes lorsque la température est inférieure à 10°C (Noordhuis *et al.*, 1992) entraîne une altération des fonctions respiratoire et nutritionnelle. Ce phénomène peut en outre avoir été amplifié par une différence importante entre la température relevée dans le milieu naturel pendant la période estivale au cours de laquelle l'expérimentation a été réalisée (T°C de l'eau lors du prélèvement *in situ* : 22-23°C) et la température d'exposition en laboratoire. Toujours est-il que cette perturbation importante de la physiologie des organismes, reflétée par une forte mortalité et l'absence de fixation, a pu générer l'obtention d'une réponse atypique du système MDMX.

D'un point de vue global, l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette expérimentation montre une réponse cohérente : l'exposition aux températures les plus extrêmes et les plus stressantes a entraîné une perturbation du profil de réponse qui se traduit par une réduction de la dépuration. La température du milieu étant susceptible d'exercer un effet modulateur sur la dépuration de l'activité MDMX, il est apparu primordial de procéder de manière homogène en maintenant une température constante dans le milieu.

#### Résumé

- L'exposition à une température de 22°C n'a pas perturbé le profil de dépuration, qui est resté similaire à celui obtenu dans le milieu témoin.
- L'exposition à des températures de 4 et 29°C entraîne un ralentissement du processus de dépuration.
- La perturbation la plus importante a été observée dans le milieu exposé à 4°C, en regard du ralentissement du profil de dépuration, de l'altération du comportement de fixation, et de la réduction de la survie des dreissènes.



**Figure 30 :** Evolution de l'activité MDMX initiale mesurée chez des dreissenés prélevées à La Maxe (A) et de l'activité dépurée mesurée chez ces mêmes dreissenés après 8 jours en eau déchlorée en laboratoire (B) de novembre 2000 à Octobre 2002. Les résultats présentés sont les moyennes et écart-types des valeurs obtenues pour des nombres variables de lots (3 à 12) selon les expérimentations (les barres inférieures des écart-types ne sont pas présentées sur la figure pour une meilleure lisibilité).

### III – Activité MDMX basale

Le travail présenté ici n'a pas été conçu comme une expérimentation, mais rassemble et synthétise, *a posteriori*, l'ensemble des résultats concernant la dépuration de l'activité MDMX obtenus au cours des différentes expérimentations réalisées durant ce travail de thèse.

Cette synthèse a été effectuée afin de

- Déterminer le facteur de dépuration de l'activité MDMX
- Suivre les niveaux d'activité MDMX chez les dreissènes autochtones de La Maxe qui est le site de prélèvement de tous les organismes utilisés (Chapitre 2.1 § II)
- Suivre les niveaux d'activité après dépuration en laboratoire

Nous disposons des mesures de l'activité initiale réalisées le lendemain du prélèvement des dreissènes à La Maxe, et des mesures de l'activité dépurée après un séjour des organismes de huit jours en eau déchlorée en laboratoire. L'ensemble de ces données a été acquis selon le protocole décrit dans le chapitre 2.2 (§ II-A-2).

La conformité à une loi normale des distributions statistiques analysées a été vérifiée avec un test de normalité de Kolmogorov-Smirnov (KS,  $\alpha=0,05$ ). Bien que les variances ne soient pas strictement homogènes (test de Levene,  $p<0,05$ ), nous avons appliqué le test *t* de Student ( $\alpha=0,05$ ), suffisamment robuste, pour comparer deux moyennes. L'ANOVA non paramétrique de Kruskal Wallis (KW,  $\alpha=0,05$ ) a été utilisée pour la comparaison de plusieurs moyennes. Les intervalles de confiance à 90% de la moyenne des résultats acquis pour les activités initiale et basale sont définis comme

$$P[\bar{x} - 1,645s_x < \bar{x} < \bar{x} + 1,645s_x] = 0,9$$

$\bar{x}$  étant la moyenne de l'échantillon et  $s_x$ , l'écart-type.

#### A – Activité initiale

La figure 30-A présente l'ensemble des résultats obtenus pour la mesure de l'activité initiale chez les dreissènes prélevées à La Maxe pendant une période qui s'étend de novembre 2000 à octobre 2002. Les mois pour lesquels aucune donnée n'est disponible

**Tableau XI :** Résultats des tests statistiques effectués afin de comparer les niveaux d'activité initiale (A) et dépurée (B) obtenus au cours de deux (Test t,  $\alpha=0,05$ ) ou plusieurs (Kruskal Wallis,  $\alpha=0,05$ ) expérimentations réalisées le même mois au sein d'une même année ou sur deux années consécutives ( $p$  = niveau de significativité).

A

Activité Initiale

Mois	Nombre d'expérimentations	Nombre de lots par expérimentation	Test	p
Mars	2001	9	Kruskal Wallis	0,0002
	2002 A	12		
	2002 B	5		
Avril	2001	9	Kruskal Wallis	0,0149
	2002 A	9		
	2002 B	5		
Juin	2002 A	3	Student	0,031599469
	2002 B	8		
Juillet	2001	9	Student	0,351382143
	2002	3		
Août	2001	6	Kruskal Wallis	0,0102
	2002 A	3		
	2002 B	6		
	2002 C	6		
Septembre	2001 A	9	Kruskal Wallis	0,026
	2001 B	6		
	2002	3		
Octobre	2001	4	Kruskal Wallis	0,0014
	2002 A	3		
	2002 B	3		
	2002 C	6		
	2002 D	9		
Novembre	2000	3	Student	0,807017239
	2001	3		

B

Activité Dépurée

Mois	Nombre d'expérimentations	Nombre de lots par expérimentation	Test	p
Mars	2001	9	student	0,773597948
	2002	3		
Avril	2001	9	Kruskal Wallis	0,0479
	2002 A	9		
	2002 B	5		
Juillet	2001	9	Student	0,001858521
	2002	3		
Août	2002 A	3	Student	0,877579429
	2002 C	6		
Septembre	2001 A	9	Kruskal Wallis	0,1471
	2001 B	3		
	2002	3		
Octobre	2001	3	Kruskal Wallis	0,007
	2002 A	3		
	2002 B	3		
	2002 C	3		
	2002 D	6		
Novembre	2000	3	Student	0,945889081
	2001	3		

correspondent à des périodes où aucune expérimentation de ce type n'a été menée. Au contraire, les résultats de plusieurs expérimentations différentes sont parfois disponibles pour le même mois.

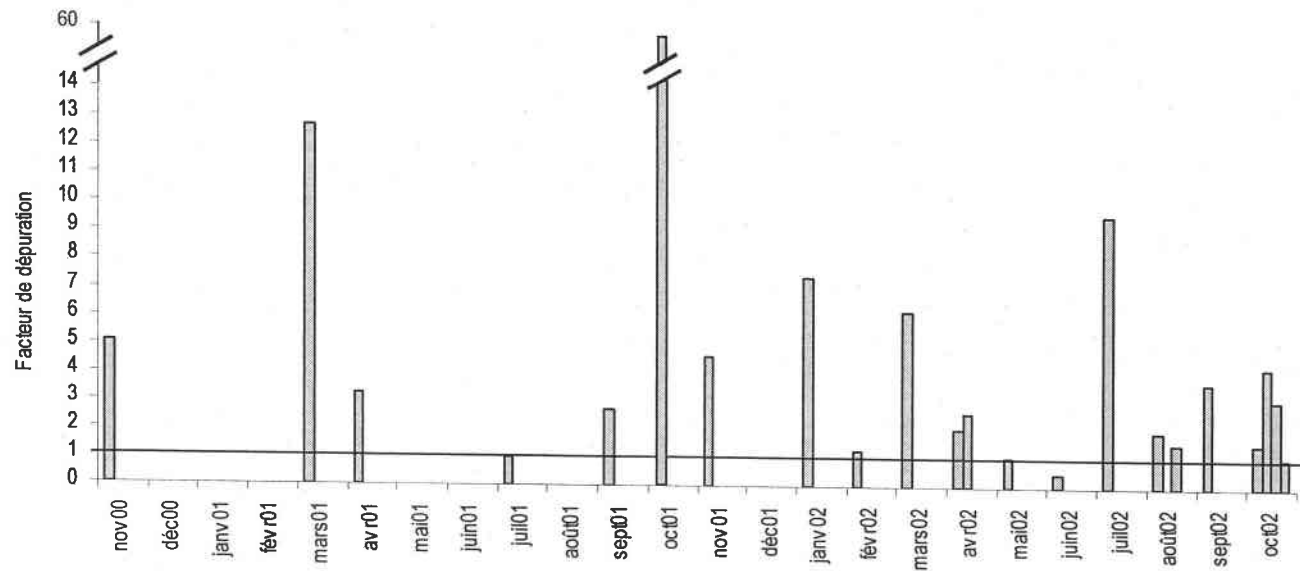
Les valeurs de l'activité initiale suivent une distribution normale (KS,  $p > 0,05$ ). Les résultats de l'ANOVA non paramétrique montrent une variabilité significative de l'activité initiale mesurée chez les organismes prélevés à La Maxe en fonction du temps (KW,  $p < 0,0001$ ). Ainsi, le niveau d'activité initiale peut varier de manière significative pour un mois donné, que ce soit au cours de la même année ou sur l'ensemble des années étudiées (Tableau XI-A)

La moyenne et l'écart-type de l'ensemble des données ont été estimés respectivement à 40,16 et 23,8 pmol.RB/min/org. L'intervalle de confiance à 90% calculé sur ces valeurs permet de définir la limite inférieure du niveau de l'activité MDMX mesuré chez les dreissènes autochtones de La Maxe à 1,01 et la limite supérieure à 79,31 pmol.RB/min/org.

## B – Activité dépurée

La figure 30-B présente l'ensemble des résultats obtenus pour la mesure de l'activité dépurée chez les dreissènes ayant passé huit jours en eau déchlorée en laboratoire. Il est à noter que lorsque les niveaux d'activité initiale étaient déjà très faibles, nous n'avons pas jugé nécessaire d'opérer une période de dépuration. De plus, le protocole de certaines expérimentations n'impliquant pas la réalisation d'une dépuration, les mesures d'activité dépurée ne sont par conséquent pas systématiquement disponibles.

Les résultats obtenus après huit jours de dépuration en laboratoire montrent une réduction généralement significative de l'activité MDMX. La comparaison des moyennes globales des activités initiale et dépurée montre un effet significatif de la période de dépuration pré-exposition, l'activité dépurée étant significativement différente de l'activité initiale mesurée chez les organismes autochtones (test  $t$ ,  $p < 0,0001$ ). Le test  $t$  de Student effectué pour comparer les activités initiale et dépurée à l'occasion de chacune des expérimentations recensées ici montre que la dépuration a été significative dans la majeure partie des cas, excepté pour cinq expérimentations réalisées au cours des mois de février, avril, mai, juin et août 2002.



*Figure 31 : Facteur de dépuration de l'activité MDMX, défini comme le rapport de l'activité initiale sur l'activité dépurée. La valeur du facteur de dépuration égale à 1, signifiant que l'activité est restée stable et n'a pas dépuré, a été signalée sur le graphique par une ligne horizontale.*

Les valeurs de l'activité dépurée suivent une distribution normale (KS,  $p > 0,05$ ). Les résultats de l'ANOVA non paramétrique montrent une variabilité significative de l'activité dépurée en fonction du temps (KW,  $p < 0,0001$ ). Ainsi, le niveau d'activité dépurée peut varier de manière significative pour un mois donné (Tableau XI-B), mais ces variations sont moins nombreuses que dans le cas de l'activité initiale. Globalement, même si une variabilité de l'activité dépurée est mise en évidence par ces résultats, elle semble toutefois moins marquée que celle de l'activité initiale mesurée avant dépuration.

La moyenne et l'écart-type de l'ensemble des données ont été estimés respectivement à 12,4 et 9,9 pmol.RB/min/org. L'intervalle de confiance à 90% calculé sur ces valeurs permet de définir la limite inférieure du niveau de l'activité dépurée à -3,90 et la limite supérieure à 28,7 pmol.RB/min/org. La valeur négative obtenue pour la limite inférieure ne correspondant à aucune réalité biologique, elle a été rapportée à zéro.

### C – Facteur de dépuration

Outre le travail sur les activités initiale et dépurée, une seconde approche a consisté à calculer les facteurs de dépuration obtenus pour chaque expérimentation (activité initiale moyenne / activité dépurée moyenne) afin de déterminer si ces facteurs sont variables au même titre que les valeurs brutes (Figure 31).

Les facteurs calculés pour les mois de février, mai, juin et pour une des expérimentations d'octobre 2002 sont voisins de 1, ce qui signifie que l'activité n'a pas dépuré au cours des huit jours passés en laboratoire. Excepté dans le cas du mois d'octobre, les activités n'ayant pas dépuré étaient déjà très faibles après le prélèvement des dreissènes. Ce résultat justifie et confirme les décisions parfois prises de ne pas effectuer de dépuration lorsque l'activité est déjà faible (inférieure au seuil défini de 28.7 pmol.RB/min/org). En effet, l'activité mesurée est déjà proche d'un niveau basal.

Dans les autres cas, les facteurs de dépuration se sont échelonnés de 1 à 10 pour la plupart. Le facteur calculé pour le mois de mars 2001 atteint 13. Signalons que le facteur de dépuration calculé pour le mois d'octobre 2001 (59,21) n'a pas été intégré dans le calcul de la valeur seuil présentée ci-après car il est apparu aberrant par rapport aux autres résultats.

Les facteurs de dépuration calculés suivent une distribution normale (KS,  $p > 0,05$ ). La moyenne et l'écart-type de l'ensemble de ces résultats ont été estimés respectivement à 3,7



et 3,1. L'intervalle de confiance à 90% calculé sur ces valeurs permet de définir la limite inférieure de l'amplitude de la dépuration à  $-1,46$  (soit 0) et la limite supérieure à  $8,85$ .

Dans l'ensemble, ces résultats montrent que les facteurs de dépuration, comme les valeurs de l'activité, sont variables sur l'ensemble de la période étudiée. Il semble, à quelques exceptions près, qu'il soit d'autant plus important que l'activité initiale est élevée, tendant ainsi à réduire l'activité à une gamme de valeurs plus restreinte. Cette hypothèse est également cohérente avec le fait que des activités initiales faibles ne dépurent pas et restent stables même après huit jours en eau déchlorée.

## D – Bilan

La variabilité des niveaux d'activité initiale et dépurée justifie le choix d'effectuer une dépuration pré-exposition des organismes utilisés avant chaque expérimentation. De plus, la mesure de l'activité dépurée peut ainsi constituer un critère relativement stable et commun à toutes les expérimentations visant à étudier les réactions de l'activité MDMX. En effet, comparer les résultats obtenus relativement à cette valeur, qui reste certes variable, mais avec une amplitude beaucoup plus réduite que dans le cas de l'activité initiale semble plus juste. Cette approche est également décrite par Smital *et al.* (2000). Ils précisent qu'une période de dépuration de 5 à 7 jours paraît suffisante pour réduire l'activité MDMX à son niveau basal.

Le phénomène de dépuration met en évidence les capacités de réaction relativement rapide du système MDMX. En absence de composés substrats ou de stress environnemental, les organismes n'activent plus la défense MDMX et le niveau retourne à un niveau basal. Les organismes semblent pouvoir maintenir un niveau de base relativement stable lorsque ils sont placés en eau déchlorée. S'il est un peu ambitieux de chercher à déterminer une valeur seuil de l'activité basale, nos résultats suggèrent toutefois l'existence d'une « gamme » d'activité basale relativement stable se situant entre 0 et  $28,7$  pmol.RB/min/org chez les dreissènes originaires de La Maxe.

### Résumé

- La dépuration de l'activité MDMX est significative après 8 jours de dépuration.
- L'activité basale est réduite à une gamme de valeurs comprises entre 0 et  $28,7$  pmol.RB/min/org

## Chapitre 3.3 : Comportement de l'activité MDMX chez *Dreissena polymorpha* exposée à différents stress et Potentiel Inhibiteur

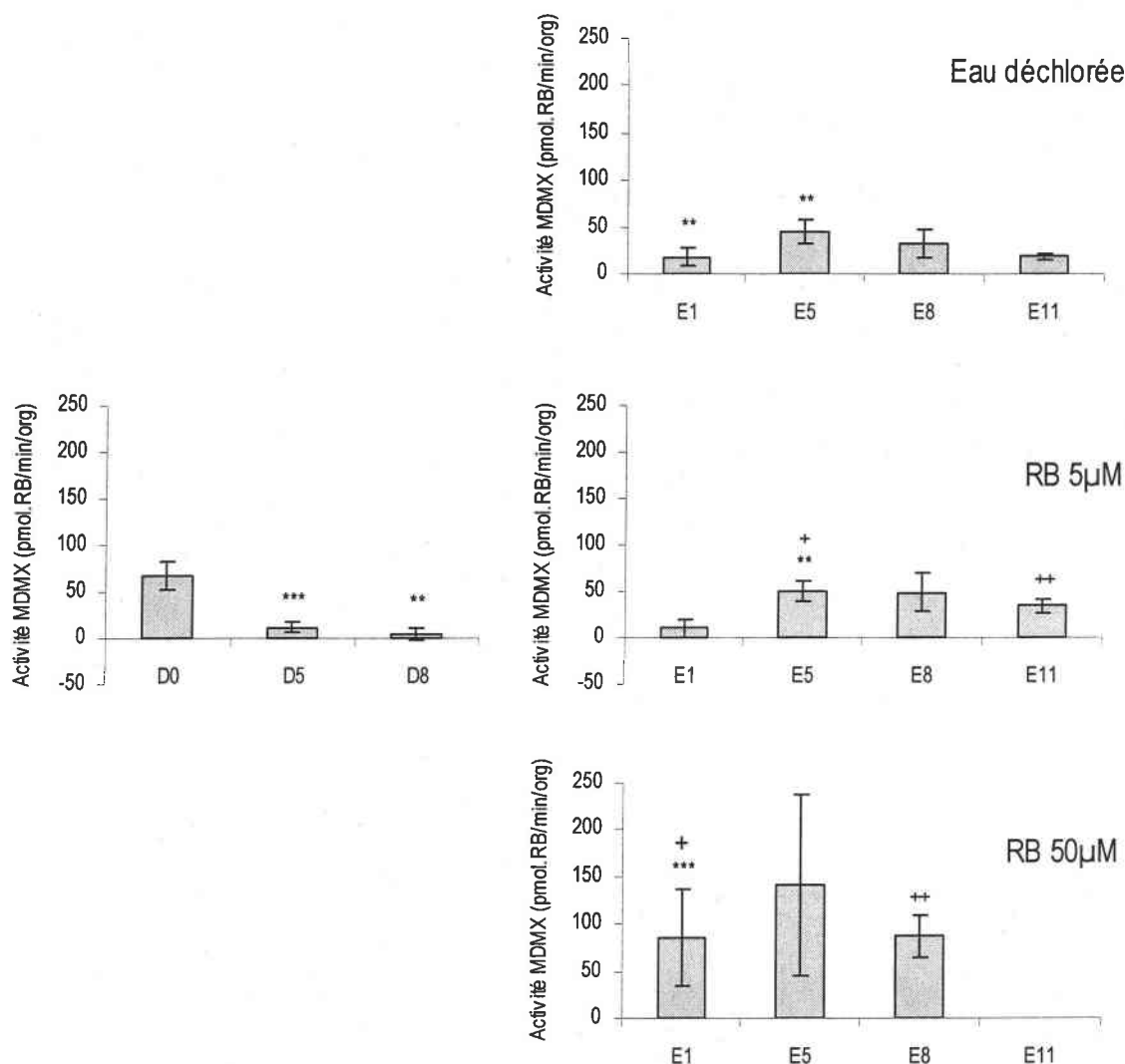
Devant l'ampleur de la dégradation des écosystèmes naturels, il s'est avéré nécessaire de comprendre et d'évaluer l'effet de l'exposition à différents types de pollution sur les populations dans leur habitat naturel. Dans ce but, les marqueurs biologiques cherchent à caractériser l'effet des polluants aux différents niveaux d'organisation d'un écosystème. Parmi ces outils figurent les biomarqueurs qu'on peut définir comme un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental qui révèle l'exposition à au moins une substance chimique à caractère polluant (Lagadic *et al.*, 1997a).

L'objectif de nos travaux est de mettre en évidence le potentiel biomarqueur de l'activité MDMX évaluée chez *Dreissena polymorpha*. Dans ce but, il est nécessaire d'évaluer les capacités de cette activité à refléter l'exposition à des substances à caractère polluant. Dans ce chapitre, nous cherchons à mettre en évidence la réaction du système MDMX face à l'exposition à un stress et notamment suite à l'exposition à un stress polluant. Dans la mesure où cette réaction existe, il est nécessaire de déterminer si elle se distingue clairement d'un bruit de fond et si elle est directement reliée à l'exposition. L'objectif recherché en parallèle consiste à déterminer si la réaction apparaît spécifique d'un type de perturbation.

Ce chapitre est consacré à la présentation des résultats obtenus dans l'optique d'apporter des éléments de réponse aux interrogations soulevées précédemment. Dans un premier temps, des expérimentations dites « théoriques » ont été mises en place afin de comprendre la réaction du système MDMX en laboratoire lorsque des dreissènes sont exposées à des composés substrats en concentrations connues. Dans un deuxième temps, des expérimentations réalisées dans des conditions naturelles seront décrites. Cet aspect a été développé dans le but de cerner la réaction de l'activité MDMX en conditions réelles, c'est à dire dans des conditions naturelles non contrôlées, où nombre de facteurs peuvent intervenir et moduler la réponse. En parallèle, le potentiel inhibiteur de différentes eaux naturelles a été évalué dans le but de déterminer dans quelle mesure il peut être utilisé comme indicateur du potentiel des eaux à interagir avec le système MDMX et, en conséquence comme indicateur de contamination organique du milieu.

Dépuration pré-exposition

Exposition



**Figure 32 :** Evolution de l'activité MDMX chez des dreissènes prélevées à La Maxe (D0), dépurées en laboratoire pendant 8 jours (D5 et D8), puis exposées à deux concentrations de rhodamine B, RB5µM et RB50µM pendant 1, 5, 8 et/ou 11 jours (E1, E5, E8 et/ou E11). Le milieu témoin est constitué d'eau déchlorée.

Les symboles \* indiquent que l'activité mesurée est significativement différente de celle mesurée à la date précédente (\* :  $p<0,1$  ; \*\* :  $p<0,05$  ; \*\*\* :  $p<0,01$ ). Les symboles + indiquent que l'activité mesurée est significativement différente du témoin (+ :  $p<0,1$  ; ++ :  $p<0,05$ ).

## I – Cas « théoriques » : réaction de l'activité MDMX en laboratoire

### A – La Rhodamine B, un marqueur de l'activité MDMX

#### 1 – Objectifs

La rhodamine B (RB) est un colorant fluorescent de la famille des xanthènes couramment utilisé comme substrat du MDMX et comme marqueur de son activité (Eytan *et al.*, 1997 ; Smital et Kurelec, 1997, 1998b). Les travaux portant sur l'étude du MDMX ont montré que l'activité pouvait être induite suite à l'exposition à des composés substrats (Chapitre 1 § III). La RB étant substrat du MDMX, nous avons mis en place une expérimentation visant à tester son potentiel inducteur sur l'activité MDMX mesurée chez la dreissène. En parallèle, l'évolution des taux de mortalité et de fixation a été suivie afin d'évaluer l'impact de l'exposition sur la survie et la physiologie des dreissènes. Les résultats présentés sont représentatifs de deux expérimentations effectuées dans les mêmes conditions.

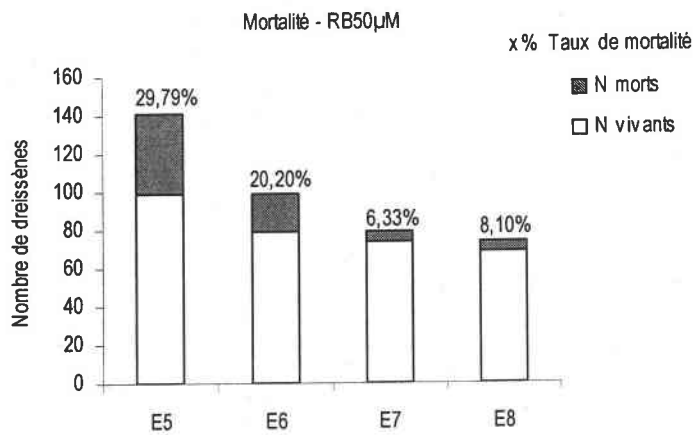
#### 2 – Dépuration pré-exposition

L'activité MDMX a été contrôlée par la méthode d'efflux sur 9 lots de dreissènes le lendemain de leur prélèvement (D0) et après 5 et 8 jours de dépuration en laboratoire (D5, D8).

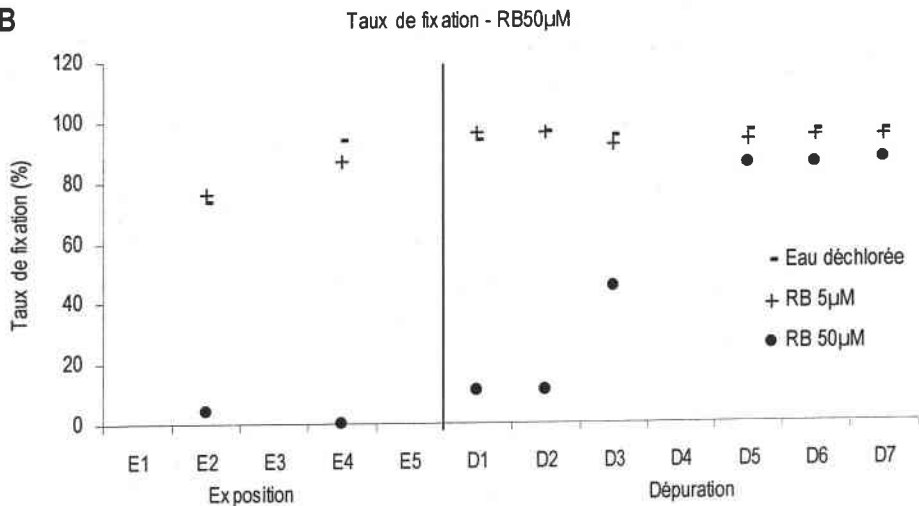
Les dreissènes prélevées à La Maxe présentaient un niveau d'activité MDMX de l'ordre de 70 pmol.RB/min/org (Figure 32). L'activité a été significativement réduite dès 5 jours de dépuration. Le faible niveau mesuré à D8 confirme l'efficacité de la dépuration et permet de considérer qu'un niveau proche du niveau basal a été atteint.



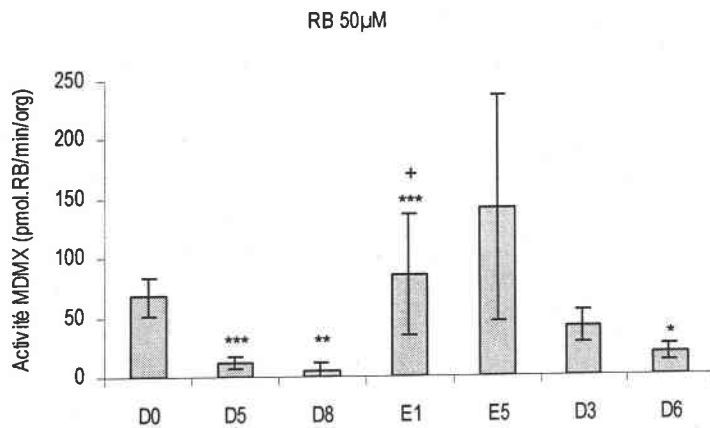
**A**



**B**



**C**



**Figure 33 : Réponse des dreissènes exposées à RB 50 $\mu$ M.**

**A :** Mortalité des dreissènes pendant la période d'exposition à RB 50 $\mu$ M.

**B :** Evolution du taux de fixation au substrat des dreissènes exposées à RB 50 $\mu$ M puis replacées en eau déchlorée (Dépuration).

**C :** Evolution de l'activité MDMX chez des dreissènes prélevées à La Maxe (D0), dépurées en laboratoire pendant 8 jours (D5, D8), exposées pendant 5 jours à RB 50 $\mu$ M (E1, E5), puis replacées en eau déchlorée pendant 6 jours (D3, D6). Les symboles utilisés pour présenter les résultats statistiques sont les mêmes que ceux décrits sur la figure 32.

### 3 – Exposition à la rhodamine B

Trois groupes de 90, 125 et 140\* dreissènes dépurées ont été exposés respectivement, au milieu témoin (4,5L d'eau déchlorée), et à 2 concentrations de RB (4,5L d'eau déchlorée additionnée de rhodamine B à 5 et 50 $\mu$ M). Les milieux n'ont pas été renouvelés pendant l'exposition.

#### 3.1. Mortalité et taux de fixation

Au cours de l'expérimentation, aucune mortalité n'a été observée chez les dreissènes témoin. Chez les dreissènes exposées à 5 $\mu$ M de RB, un individu est mort après 8 jours d'exposition. En revanche, une mortalité plus importante (30%) a été enregistrée après 5 jours d'exposition à 50 $\mu$ M (Figure 33-A). Le taux de mortalité s'est ensuite stabilisé à moins de 10% après 7 et 8 jours d'exposition. La figure 33-B présente l'évolution des taux de fixation des dreissènes au cours de cette expérimentation. Les résultats montrent nettement une absence de fixation au cours de l'exposition à 50 $\mu$ M de RB, alors que les dreissènes exposées à 5 $\mu$ M se fixent rapidement au substrat de la même manière que dans le milieu témoin. En parallèle, l'observation du comportement des organismes exposés à 50 $\mu$ M a montré une augmentation du temps de fermeture de la coquille après stimulation.

#### 3.2 – Activité MDMX

Les niveaux d'activité MDMX ont été contrôlés sur trois lots de 5 dreissènes après 1, 5, 8 et 11 jours d'exposition (E1, E5, E8 et E11), excepté dans le cas de l'exposition à 50 $\mu$ M où la forte mortalité et le mauvais état de santé des organismes n'a pas permis d'effectuer la mesure E11. Le protocole de mesure de l'activité MDMX permet d'utiliser les mêmes lots d'organismes pour effectuer plusieurs mesures afin de limiter la variabilité et de comparer plus aisément plusieurs mesures. Ce protocole a été respecté dans le cas des mesures réalisées chez les organismes exposés au milieu témoin et à 5 $\mu$ M de RB. Dans le cas de l'exposition à 50 $\mu$ M, la mortalité importante survenue dans les lots servant aux

\* Il a été décidé d'utiliser un nombre de dreissènes d'autant plus important que le milieu d'exposition est stressant, et ceci, en prévision d'une éventuelle mortalité.

différentes mesures nous a contraint à remplacer les organismes morts par des organismes exposés aux mêmes conditions.

L'activité MDMX mesurée aux différents temps d'exposition chez les dreissènes témoin s'est échelonnée entre 20 et 45 pmol.RB/min/org (Figure 32). Une augmentation de l'activité a en effet été observée aux premiers jours de l'exposition au milieu témoin. Cette réaction est probablement liée aux conditions de l'expérimentation dans la mesure où l'on ne peut exclure que le maintien des organismes en laboratoire soit susceptible de générer un stress. Le profil de réponse obtenu chez les dreissènes exposées à 5 $\mu$ M ne diffère pas significativement du témoin, excepté à la date J11 pour laquelle l'activité mesurée est supérieure au témoin (Figure 32). En revanche, l'exposition à 50 $\mu$ M a provoqué une induction importante de l'activité dès 24 heures d'exposition, qui se confirme après 5 et 8 jours d'exposition (Figure 32). Cette induction est significative à toutes les dates par rapport à l'activité mesurée après 8 jours de dépuration ( $p < 0,05$ ). Elle est significative à J1 ( $p < 0,088$ ) et à J8 ( $p < 0,05$ ) par rapport à l'activité mesurée dans le milieu témoin. La variabilité importante obtenue à cette dose d'exposition, illustrée par de grands écart-types peut s'expliquer d'une part, par une perturbation non négligeable de la physiologie des dreissènes et d'autre part, par une forte mortalité qui nous obligeait à remplacer une partie des organismes d'une date à l'autre.

#### 4 – Dépuration post-exposition chez les dreissènes exposées à 50 $\mu$ M de RB

A partir de 5 jours d'exposition, 30 dreissènes exposées au milieu RB 50 $\mu$ M ont été remplacées en eau déchlorée et l'évolution des niveaux d'activité a été contrôlée après 3 et 6 jours de dépuration sur trois lots de 5 dreissènes (D3 et D6).

Les résultats obtenus montrent la dépuration progressive de l'activité et la réversibilité du phénomène d'induction (Figure 33-C). Cette réversibilité est confirmée par les observations montrant une augmentation progressive du taux de fixation des dreissènes pendant cette phase de dépuration post-exposition (Figure 33-B). En effet, dès 3 jours les dreissènes recommencent à se fixer normalement. Ces observations confortent l'idée que les dreissènes ont difficilement supporté l'exposition à une forte dose de RB. En revanche,

le stress généré par l'exposition disparaît très rapidement une fois les organismes replacés en eau déchlorée.

## 5 – Bilan

L'exposition des organismes à la RB permet de mettre en évidence l'effet d'un composé substrat avéré sur l'activité MDMX. A  $5\mu\text{M}$  le profil de réponse obtenu reste très proche de celui obtenu dans le milieu témoin. La mesure de l'activité après 24 heures d'exposition à  $5\mu\text{M}$  montre une absence d'induction, ce qui permet de confirmer que l'exposition à cette concentration pendant la phase de charge effectuée au cours de la méthode d'efflux n'a pas d'effet sur l'activité mesurée (Chapitre 3.1 § II-C). L'exposition à  $50\mu\text{M}$  de RB provoque au contraire une induction nette dès 24 heures d'exposition. Cette induction se confirme par la suite. Cependant, il est à noter que l'importance des écart-types empêche la significativité de l'induction par rapport à celle mesurée à  $5\mu\text{M}$ . Ces écart-types s'expliquent probablement par un mauvais état physiologique des organismes, reflété par une forte mortalité. Les travaux de Smital et Kurelec (1998b) ont montré une induction significative de l'activité MDMX mesurée chez des moules marines (*Mytilus galloprovincialis*) exposées pendant 5 jours à  $1\mu\text{M}$  de rhodamine 123, un autre substrat du MDMX de la famille des xanthènes. Nos résultats chez la dreissène montrent un processus d'induction plus long et moins sensible puisqu'il faut attendre 11 jours pour obtenir une réaction significative à  $5\mu\text{M}$ .

Dans notre expérimentation, l'activité mesurée à  $5\mu\text{M}$  se distingue difficilement du témoin. A  $50\mu\text{M}$ , l'induction existe mais elle reste non significative et largement biaisée par des écart-types importants. Même si un effet concentration est observé, il reste relativement peu marqué dénotant peut-être une sensibilité assez réduite en laboratoire, malgré une amplitude de réaction importante. Il serait toutefois envisageable de préciser ces résultats en testant une ou plusieurs concentrations intermédiaires, moins stressantes pour les organismes, afin de déterminer si la réaction se distinguerait significativement de la dose  $5\mu\text{M}$ .

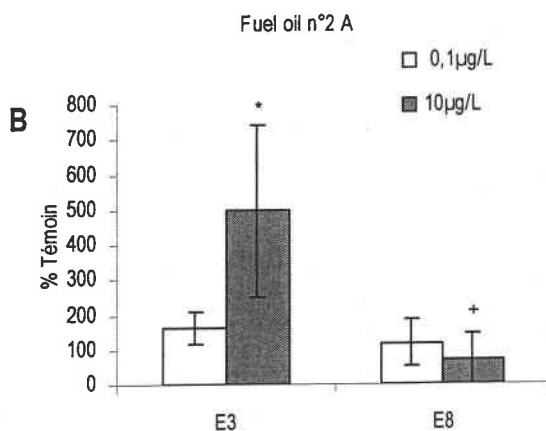
### Résumé

- 24 heures d'exposition à  $5\mu\text{M}$  n'engendrent pas d'induction de l'activité MDMX.
- A  $5\mu\text{M}$ , la réponse obtenue ne se distingue pas clairement du témoin.
- A  $50\mu\text{M}$ , l'induction est très marquée, mais l'importante variabilité des résultats empêche la significativité de la réponse.



**A**

Dépuration pré-exposition	D0	36,96 (17,37)
	D8	13,72 (7,43)
Dépuration post-exposition	D'8	21,45 (3,39)



**Figure 34 :** Comportement de l'activité MDMX chez des dreissènes exposées à un mélange d'hydrocarbures, le fuel oil n°2 (expérimentation A).

**A :** Tableau présentant les résultats (moyennes et écart-types) des mesures de l'activité MDMX effectuées aux différents temps des périodes de dépuración pré- (D0 et D8) et post-exposition (D'8).

**B :** Evolution de l'activité MDMX chez des dreissènes dépurées puis exposées à 0,1 et 10 µg/L du mélange d'hydrocarbures (Fuel oil n°2) pendant 3 et 8 jours (E3 et E8). Le graphique présente les moyennes et écart-types des résultats exprimés en pourcentages des résultats obtenus dans le milieu témoin (Eau minérale). Le symbole \* indique une différence significative entre les doses d'exposition pour la date étudiée ( $p < 0,1$ ). Le symbole + indique une différence significative entre les dates pour la dose étudiée ( $p < 0,05$ ).

## B – Pollution de type « hydrocarbures »

### 1 – Objectifs

L'objectif des deux expérimentations présentées ci-après était de mettre en évidence le potentiel inducteur d'un mélange d'hydrocarbures (fuel oil n°2, Sigma). Les principales propriétés de ce produit sont référencées en annexe 3. Un mélange de ce type s'est avéré substrat du MDMX chez *Dreissena polymorpha* (Smital et Kurelec, 1997), *Anodonta cygnea* (Kurelec et Pivcevic, 1991) et *Mytilus galloprovincialis* (Kurelec, 1995b). De plus, son potentiel inducteur a été démontré chez *Monodonta turbinata* (Kurelec *et al.*, 1995b), *Corbicula fluminea* (Kurelec *et al.*, 1996b) et *Mytilus galloprovincialis* (Smital et Kurelec, 1998b). Deux expérimentations complémentaires ont été effectuées avec ce mélange. A partir des résultats obtenus au cours de la première expérimentation, le protocole a été affiné et amélioré pour la seconde.

### 2 – Expérimentation A

#### 2.1 – Dépuration pré-exposition

Le niveau initial de l'activité MDMX présenté par les dreissènes a été contrôlé par la méthode d'efflux le lendemain du prélèvement (D0) et après 8 jours de dépuration en laboratoire (D8). Pendant la période de dépuration, les dreissènes ont été placées dans des bacs contenant 4,5 L d'eau minérale (Cristalline, Annexe 4) renouvelée tous les deux jours et additionnée de nourriture liquide pour invertébrés aquatiques (JBL Korallfluid). Les mêmes lots d'organismes (9 lots de 5 dreissènes) ont été utilisés pour les mesures à D0 et D8.

Le niveau d'activité initiale mesuré chez les dreissènes prélevées à La Maxe a été significativement réduit d'environ un tiers après 8 jours de dépuration en laboratoire (Figure 34-A).

## 2.2 – Exposition au mélange d'hydrocarbures

Les neuf lots utilisés pour les mesures précédentes ont été répartis dans les trois milieux d'exposition (450 mL), à savoir, le milieu témoin constitué d'eau minérale et deux milieux constitués de la même eau contaminée par du fuel oil n°2 (Sigma) aux concentrations de 0,1 et 10µg/L. Les niveaux d'activité MDMX ont été contrôlés après 3 et 8 jours d'exposition à ces milieux (E3 et E8). Les milieux ont été renouvelés et additionnés de nourriture au jour E4. Aucune mortalité n'a été enregistrée dans les trois milieux d'exposition.

L'activité mesurée chez les dreissènes exposées à 0,1 µg/L a été multipliée en moyenne par 1,4 par rapport au milieu témoin aux deux durées d'exposition testées (Figure 34-B). Après 3 jours d'exposition à 10µg/L, une induction importante (x 5) et significative a été mesurée chez les dreissènes exposées. Cependant, cette induction ne s'est pas maintenue. En effet, une réduction importante de l'activité a été mesurée après 8 jours d'exposition (Figure 34-B).

## 2.3 – Dépuration post-exposition

Après la période d'exposition, les dreissènes ont été replacées en eau minérale (1,7 L) et l'activité a été contrôlée après 8 jours de dépuration (D'8). Pendant la dépuration, le milieu est renouvelé tous les deux jours.

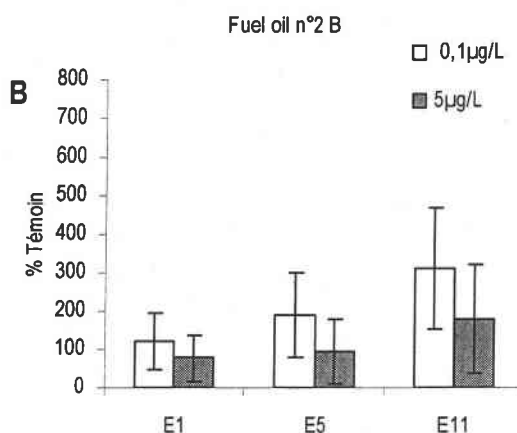
Après 8 jours de dépuration, l'activité tend à retrouver son niveau basal, c'est à dire le niveau mesuré juste avant l'exposition (Figure 34-A).

## 2.4 – Bilan

L'exposition à 0,1µg/L de fuel oil n°2 a engendré une légère induction du système MDMX ; à 10µg/L, l'induction mesurée est très importante après 3 jours d'exposition, mais l'activité est considérablement réduite après 8 jours, suggérant une forte perturbation de l'activité ou des organismes à cette dose pendant cette durée, bien qu'aucune mortalité

**A**

Dépuration pré-exposition	D0	32,86 (6,76)
	D6	16,20 (7,68)
Dépuration post-exposition	D5	15,69 (5,13)



**Figure 35 : Comportement de l'activité MDMX chez des dreissènes exposées à un mélange d'hydrocarbures, le fuel oil n°2 (expérimentation B).**

**A :** Tableau présentant les résultats (moyennes et écart-types) des mesures de l'activité MDMX effectuées aux différents temps des périodes de dépuración pré- (D0 et D6) et post-exposition (D5).

**B :** Evolution de l'activité MDMX chez des dreissènes dépurées puis exposées à 0,1 et 5 µg/L du mélange d'hydrocarbures (Fuel oil n°2) pendant 1, 5 et 11 jours (E1, E5 et E11). Le graphique présente les moyennes et écart-types des résultats exprimés en pourcentages des résultats obtenus dans le milieu témoin (Eau déchlorée).

n'ait été observée dans les milieux d'exposition. Ces observations nous ont conduit à renouveler l'expérimentation pour confirmer ces résultats en améliorant les conditions d'expérimentation. Le milieu témoin, constitué d'eau minérale, a été remplacé par de l'eau déchlorée. Une concentration de 5µg/L, moins stressante pour les organismes, a été préférée à la concentration de 10µg/L.

### 3 – Expérimentation B

#### 3.1 – Dépuration pré-exposition

Le niveau initial de l'activité MDMX présenté par les dreissènes a été contrôlé par la méthode d'efflux le lendemain du prélèvement (D0) et après 6 jours de dépuration en laboratoire (D6). Pendant la période de dépuration, les dreissènes ont été placées dans des bacs contenant 4,5 L d'eau déchlorée renouvelée tous les jours et additionnée de nourriture liquide pour invertébrés aquatiques (JBL Korallfluid). Les mêmes lots d'organismes (9 lots de 5 dreissènes) ont été utilisés pour les mesures à D0 et D6.

Les niveaux d'activité initiale mesurés chez les dreissènes prélevées à La Maxe ont été significativement réduits de moitié après 6 jours de dépuration en laboratoire (Figure 35-A).

#### 3.2 – Exposition au mélange d'hydrocarbures

Neuf lots de dreissènes dépurées n'ayant pas été utilisés pour les mesures précédentes ont été répartis dans les trois milieux d'exposition (500 mL), à savoir, le milieu témoin constitué d'eau déchlorée et deux milieux contaminés par le fuel oil n°2 (Sigma) aux concentrations de 0,1 et 5µg/L. Les niveaux d'activité MDMX ont été contrôlés après 1, 5 et 11 jours d'exposition à ces milieux (E1, E5 et E11). Les milieux ont été renouvelés et additionnés de nourriture aux jours E2, E4 et E8. Aucune mortalité n'a été enregistrée dans les trois milieux d'exposition.

L'activité mesurée chez les dreissènes exposées à 0,1 µg/L a été multipliée par 1,2, 1,9 et 3 par rapport au milieu témoin après respectivement, 1, 5 et 11 jours d'exposition (Figure 35-B). Cependant l'induction mesurée et l'effet temps mis en évidence ne sont pas significatifs. A 5µg/L, les résultats ne montrent pas d'induction significative. L'activité semble au contraire réduite par rapport au témoin et par rapport à l'activité mesurée à 0,1µg/L, bien que ces différences ne soient pas significatives. Cependant, il faudrait déterminer s'il s'agit d'une absence de réaction ou d'une réelle réduction ou inhibition de l'activité. Après 11 jours d'exposition à 5µg/L, l'activité augmente et est multipliée par 1,8 par rapport au témoin, mais cette induction n'est pas significative (Figure 35-B).

### 3.3 – Dépuration post-exposition

Après la période d'exposition, les dreissènes ont été replacées en eau déchlorée (500 mL) et l'activité a été contrôlée après 5 jours de dépuration (D5). Pendant la dépuration, le milieu est renouvelé tous les jours.

Après cinq jours de dépuration, le niveau d'activité moyen présenté par les dreissènes a atteint le niveau mesuré avant exposition, et ce quelques soient les conditions auxquelles ont été exposés les organismes (Figure 35-A).

## 4 – Bilan des expérimentations A et B

La période de dépuration pré-exposition a permis un retour de l'activité MDMX jusqu'au même niveau de base dans les deux expérimentations.

Des travaux menés chez trois mollusques marins et dulçaquicoles ont montré que l'exposition pendant 2 à 3 jours à un autre mélange d'hydrocarbures engendrait une induction significative (25 à 50% par rapport au témoin) de l'activité MDMX (Kurelec *et al.*, 1995b, 1996b ; Smital et Kurelec, 1998b). Bien qu'il nous soit difficile de comparer directement notre travail avec ces études (concentrations de mélange exprimées par rapport à un indice d'hydrocarbures du Koweït), on peut toutefois constater que l'activité MDMX

évaluée chez la dreissène montre une réaction au moins du même ordre, même si elle n'est pas toujours significative.

L'exposition à 0,1 µg/L a provoqué une réaction de l'activité MDMX, qui même s'il elle n'est pas significative, met toutefois en évidence le potentiel inducteur du mélange d'hydrocarbures testé. De plus, la réaction est amplifiée quand la durée d'exposition est prolongée. Il serait intéressant de renouveler ce type d'expérimentation en travaillant sur une période plus longue pour vérifier si la tendance à l'induction dégagée se confirme. L'exposition à des doses 50 et 100 fois plus élevées a provoqué des réactions globalement variables et non significatives, que l'on peut probablement attribuer à l'état physiologique altéré des dreissènes. En effet, même si aucune mortalité n'a été enregistrée au cours des deux expérimentations, il est possible que leur état de santé ait été altéré par l'exposition à ces fortes concentrations. Seule la réaction obtenue après 3 jours d'exposition à 10 µg/L confirme le potentiel inducteur du mélange fuel oil n°2 chez la dreissène.

D'un point de vue global, même si une réponse est observée, elle reste relativement peu marquée confirmant peut-être une sensibilité et une amplitude de réaction assez réduite en laboratoire. Il semble en effet que seule une forte concentration puisse induire significativement l'activité, sachant qu'en contrepartie, la perturbation engendrée se traduit par une importante variabilité de la réponse.

#### Résumé

- L'exposition à 0,1 et 5 µg/L de Fuel oil n°2 a provoqué une légère induction de l'activité MDMX au cours des deux expérimentations. En complément, l'expérimentation B a permis de mettre en évidence un effet temps. Cependant, les tendances dégagées ne sont pas significatives.
- L'exposition à 10 µg/L a provoqué une induction marquée et significative après 3 jours.

**II - Cas « pratiques » = réaction de l'activité MDMX dans les milieux aquatiques naturels**

Deux aspects ont été abordés dans cette partie. Dans un premier temps, la réaction de l'activité MDMX vis à vis de la contamination des milieux naturels a été étudiée. Dans cette optique, des dreissènes ont été encagées dans plusieurs cours d'eau de la région Grand Est ou exposées en laboratoire à l'eau prélevée dans ces cours d'eau. Dans un deuxième temps, le potentiel inhibiteur des eaux naturelles a été évalué afin de mettre en évidence la présence de composés chimiosensibilisants.

Parallèlement au suivi de l'activité MDMX et à la mesure du potentiel inhibiteur, la qualité des milieux naturels étudiés a été évaluée à partir des données physico-chimiques fournies par la Banque de l'Eau Rhin-Meuse (BERM) afin de proposer un référentiel pour l'interprétation des résultats.

### **A – La Fensch (Site sidérurgique, Moselle, 57)**

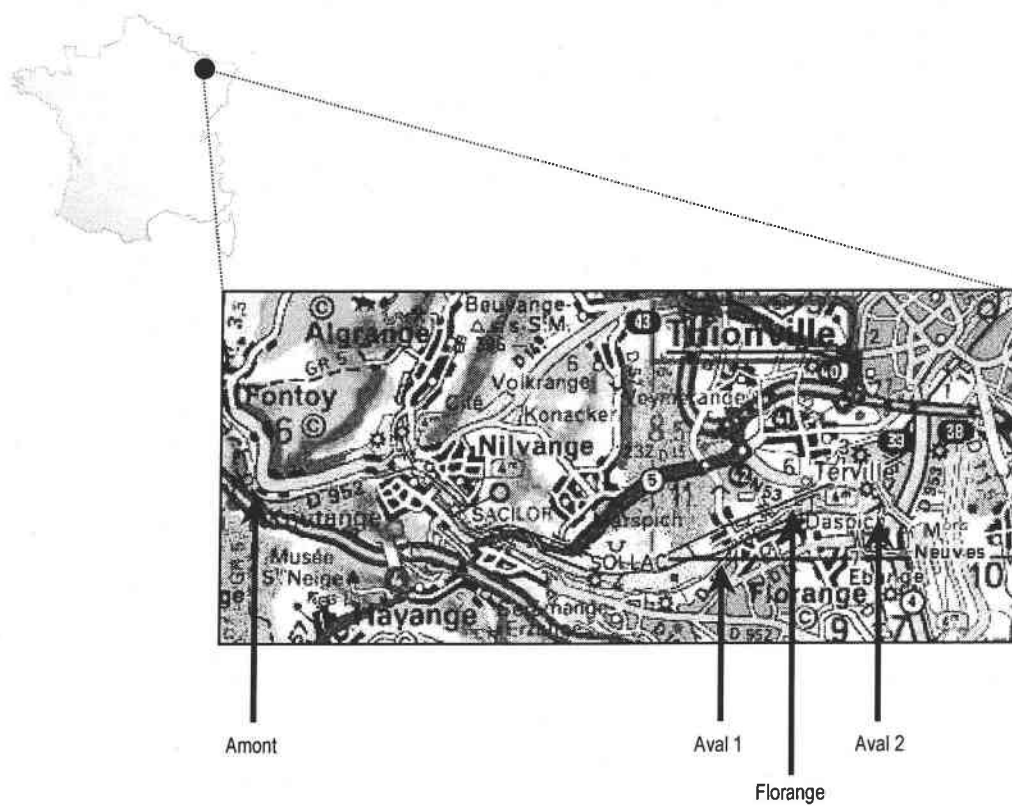
#### **1 - Objectifs**

La Fensch étant un cours d'eau particulièrement dégradé, il a été envisagé d'étudier la réaction du MDMX chez des dreissènes transférées le long d'un gradient amont-aval de son linéaire. Bien que l'utilisation de biomarqueurs dans le cadre de l'étude de milieux fortement pollués puisse apparaître injustifiée dans la mesure où la pollution et l'exposition des organismes vivants à cette pollution ne font aucun doute, il reste toutefois très intéressant, dans une optique fondamentale, de comprendre les réactions d'un système de défense biologique tel que le MDMX face à des conditions de stress polluants extrêmement marqués.

#### **2 - Présentation du cours d'eau et des sites d'étude**

La Fensch est une petite rivière qui coule dans une vallée très urbanisée et industrialisée. Après un parcours d'environ 16 km, elle se jette dans la Moselle. L'urbanisation et l'industrialisation (sidérurgie) très développées tout au long de la vallée





**Figure 36 :** Localisation des sites d'études le long de la Fensch (vallée sidérurgique en Moselle).

ont dégradé la rivière sur l'ensemble de son linéaire, d'une part en canalisant le cours d'eau au sein des installations industrielles et d'autre part en utilisant la rivière comme milieu de rejet.

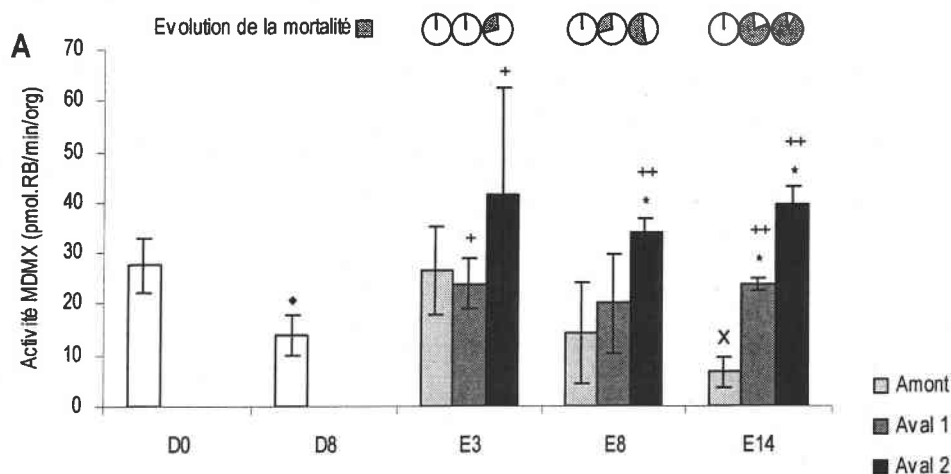
L'étude présentée ici a consisté à transférer des dreissènes sur 3 sites le long de la rivière selon un gradient amont aval qui reflète également un gradient de pollution (Cossu *et al.*, 1997 ; Doyotte *et al.*, 1997). Les sites étudiés, localisés sur les communes de Knutange (Amont), Sérémange (Aval 1) et Neuves-Maisons (Aval 2) sont répartis sur l'ensemble du linéaire, de la source à la sortie de la vallée sidérurgique (Figure 36).

Les données physico-chimiques (BERM) relevées en 2001 à Knutange, Sérémange et Florange révèlent la qualité de l'eau le long du gradient amont aval que nous avons étudié (Annexe 5). Bien qu'il soit encore très proche de la source, le site Amont présente déjà une eau de qualité passable (2)\* selon les suivis réalisés en 2001 (teneurs élevées en matières azotées, phosphorées et en sulfates). Le site Aval 1, situé en aval du rejet d'une cokerie est un site particulièrement dégradé. Suivi par la BERM depuis 1995, il est considéré comme présentant une qualité médiocre (3)\*, notamment en raison de taux élevés en hydrocarbures aromatiques polycycliques, polychlorobiphényles et métaux (Annexe 5). Le site Aval 2 n'est pas suivi par la BERM. Cependant les données recueillies sur un site localisé en amont (Florange) permettent de le considérer comme présentant une pollution excessive (M)\*. De plus, des études réalisées au sein de notre laboratoire sur le site Aval 2 font état d'un niveau de pollution assez important, ce qui n'est pas surprenant étant donné que ce site reçoit l'ensemble de la pollution drainée par la vallée (Cossu *et al.*, 1997 ; Doyotte *et al.*, 1997). Ces travaux ont montré que les sédiments prélevés sur ce site étaient considérablement contaminés, notamment par des hydrocarbures aromatiques polycycliques, essentiellement le fluoranthène et ses dérivés et le benzo(a)pyrène.

### 3 – Dépuration pré-exposition

Le niveau initial de l'activité MDMX présenté par les dreissènes a été contrôlé par la méthode d'efflux le lendemain du prélèvement (D0) et après 8 jours de dépuration en laboratoire (D8). Pendant la période de dépuration, les dreissènes ont été placées dans des

\* Les seuils et classes de qualité établis par le Réseau National de Bassin sont référencés en annexe 1.



**B**

CV%	E3	E8	E14
Amont	33	70	47
Aval 1	21	48	5
Aval 2	51	9	9

**Figure 37 : Etude de la Fensch.**

**A :** Evolution de l'activité MDMX chez des dreissènes dépurées 8 jours (D0 et D8), puis exposées pendant 3, 8 et 14 jours (E3, E8 et E14) sur les sites Amont, Aval 1 et Aval 2. Le symbole ♦ indique la significativité de la dépurée de l'activité MDMX ( $p < 0,05$ ). Le symbole + indique une différence significative par rapport à l'activité dépurée (+ :  $p < 0,09$  ; ++ :  $p < 0,05$ ). Le symbole \* indique une différence significative entre les sites pour chaque date. Le symbole x indique une différence significative entre les dates pour chaque site ( $p < 0,05$ ). L'évolution du taux de mortalité des dreissènes exposées a également été indiquée sous forme de camemberts placés au dessus des barres d'histogramme correspondantes.

**B :** Coefficients de variation (écart-type/moyenne), exprimés en pourcentages, calculés pour les réponses obtenues sur chaque site étudié pendant la période d'exposition.

bacs contenant 4.5L d'eau déchlorée renouvelée tous les jours et additionnée de nourriture congelée pour invertébrés aquatiques. Les mêmes lots d'organismes (3 lots de 5 dreissènes) ont été utilisés pour les mesures à D0 et D8.

L'activité initiale mesurée après prélèvement des dreissènes présentait déjà un niveau faible de l'ordre de 30 pmol.RB/minute/organisme. Après 8 jours de dépuración, l'activité a été réduite de moitié (Figure 37-A).

#### 4 – Exposition *in situ* le long de la Fensch

Les dreissènes ont été placées dans des cages fabriquées en grillage et transférées sur les trois sites étudiés le long de la Fensch (3 cages de 70 dreissènes par site) pendant 3, 8 et 14 jours (E3, E8, E14). A chacune de ces dates, quinze dreissènes ont été prélevées dans les cages et ramenées au laboratoire dans l'eau de leur site d'origine. La mesure de l'activité MDMX a été effectuée dès le lendemain. La mortalité des dreissènes a été estimée sur le terrain à chaque prélèvement et la température de l'eau a été relevée à E14.

Après 3 jours d'exposition *in situ*, les niveaux d'activité ont été augmentés par rapport à l'activité dépurée sur les trois sites (Figure 37-A). Le site Aval 2 présente l'induction la plus prononcée, mais également un taux de mortalité très élevé (de l'ordre de 30%) dès trois jours d'exposition.

Après 8 jours d'exposition, l'activité mesurée chez les dreissènes transférées en amont tend à diminuer (Figure 37-A). Sur les deux autres sites, l'activité s'est stabilisée au même niveau qu'après trois jours d'exposition. L'activité mesurée chez les dreissènes provenant du site Aval 2 est significativement plus élevée que celle mesurée chez les dreissènes exposées sur le site Aval 1. A cette date, une mortalité considérable a été observée au site Aval 2. Plus de la moitié des dreissènes transférées sont mortes en 8 jours. Sur le site Aval 1, la mortalité était également importante (30%) (Figure 37-A).

Après 14 jours d'exposition, la tendance observée à E8 s'est confirmée et précisée (Figure 37-A). En amont, l'activité a diminué. Sur les sites Aval 1 et 2, l'activité s'est stabilisée par rapport aux mesures antérieures, et la variabilité a été considérablement

restreinte. A cette date, une différence très significative entre les trois sites étudiés a été mise en évidence. Après 14 jours d'exposition, la mortalité a atteint 80% sur le site Aval 1. Sur le site Aval 2, seules 15 dreissènes ont survécu, ce qui nous a permis de réaliser la mesure à cette date (Figure 37-A).

Les relevés de la température de l'eau effectués à E14 montrent une augmentation importante entre l'amont et l'aval (Amont, 14°C ; Aval 1, 19°C ; Aval 2, 21°C). Un tel accroissement de la température le long d'un gradient amont-aval caractérise généralement un milieu considérablement perturbé par les activités humaines.

Le calcul des coefficients de variation montre une différence de profil entre les trois sites étudiés (Figure 37-B). Alors qu'elle s'est avérée importante sur le site Amont tout au long de l'exposition, la variabilité a progressivement diminué sur les sites les plus perturbés. Sur le site Aval 1, elle était relativement forte jusqu'à E8, mais s'est réduite à E14. Sur le site Aval 2, elle s'est considérablement réduite dès E8.

## **5 – Bilan**

### **5.1 – Mortalité**

L'exposition sur les sites Aval 1 et 2 a rapidement entraîné une mortalité importante des dreissènes encagées. En comparaison, les dreissènes transférées sur le site Amont semblaient en bonne santé et aucune mortalité n'a été enregistrée, excluant la possibilité que cette mortalité excessive puisse être due au stress de l'encagement. Au cours de l'exposition, la mortalité enregistrée ne s'est pas stabilisée et au contraire, elle a continué à augmenter. L'état de dégradation des sites étudiés a eu un impact direct sur la survie des dreissènes, ce qui confirme le caractère extrême des conditions d'exposition sur les sites les plus contaminés.

## 5.2 – Variabilité de la réponse

L'exposition sur les sites Aval 1 et 2 a entraîné une augmentation de la variabilité des résultats obtenus pour la mesure de l'activité MDMX. Cette variabilité est très importante dès trois jours d'exposition et traduit probablement le stress lié à l'exposition sur des sites contaminés. Elle se réduit ensuite progressivement. Bien que l'hypothèse d'une acclimatation des organismes aux nouvelles conditions auxquelles ils sont exposés ne puisse être exclue, il apparaît plus probable que les forts taux de mortalité aient favorisé la sélection des organismes les plus résistants. En effet, si l'exposition entraîne une forte mortalité des organismes les plus sensibles et les plus faibles, il est possible que les mesures réalisées à 8 et surtout à 14 jours l'aient été sur des organismes particulièrement résistants, ce qui se traduirait par une homogénéité des réponses. Au contraire, aucune mortalité n'étant survenue sur le site Amont, on conserve une variabilité assez importante tout au long de l'exposition, ce qui reflète probablement l'existence d'un stress sur ce site qui, bien qu'il soit en amont de la vallée, connaît déjà une perturbation marquée.

Les deux éléments discutés précédemment (mortalité et variabilité) constituent des compléments pour l'interprétation de la réponse de l'activité MDMX et permettent de mieux intégrer la réponse dans un ensemble de processus physiologiques de réaction face à un environnement stressant.

## 5.3 – Activité MDMX

Dès trois jours d'exposition, l'activité mesurée chez les dreissènes est induite par rapport à l'activité dépurée. Cette réaction assez rapide apparaît plus marquée sur le site le plus contaminé (Aval 2), malgré une variabilité importante.

**Sur le site Amont**, on observe une augmentation non significative de l'activité par rapport à l'activité dépurée. Cette augmentation pourrait correspondre à une activation du système de défense sur un site qui, même s'il est moins contaminé que les autres, présente tout de même une qualité moyenne, en particulier en raison de taux élevés en matières azotées et en sulfates. Étonnamment, l'activité mesurée dans la suite de l'expérimentation diminue. Ce comportement paraît difficile à analyser. S'agit-il d'une diminution liée à

l'acclimatation des dreissènes suite à l'encagement qui aurait provoqué une légère augmentation ? S'agit-il d'une absence de réaction, d'une inhibition de l'activité ou de la disparition (ou réduction) du facteur de stress présent à trois jours ? Pour le moment et d'après les données disponibles, il nous est impossible de conclure sur cette question dans la mesure où ce résultat ne s'est jamais reproduit au cours des autres expérimentations menées au cours de ces travaux.

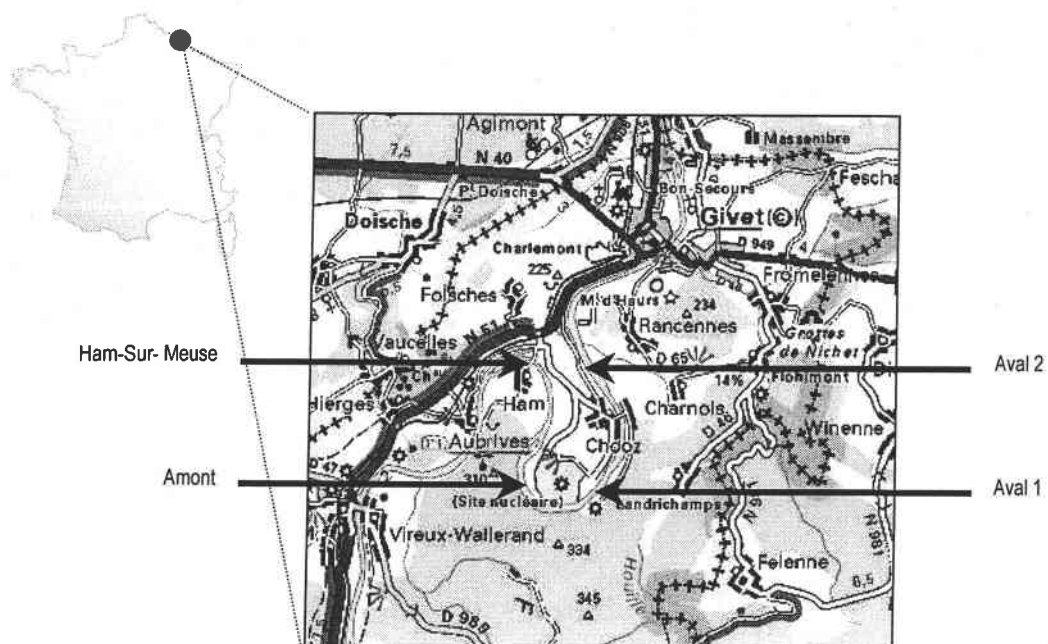
**Les sites Aval 1 et 2** présentent un profil de réaction similaire : on observe dès 3 jours une augmentation de l'activité par rapport à l'activité dépurée, en raison du stress occasionné par l'exposition sur ces sites contaminés. Cependant aucune évolution de l'activité n'a été enregistrée pendant les 14 jours de l'expérimentation, comme si l'activité était déjà à son maximum dès trois jours. Cependant, l'activité mesurée à 14 jours est tout de même significativement différente de l'activité dépurée, du fait de la réduction de la variabilité, mettant ainsi en évidence une induction nette en réponse à l'exposition sur ce site considérablement dégradé.

D'un point de vue global, l'exposition dans cette rivière a entraîné une induction très nette de l'activité MDMX par rapport à l'activité dépurée après 14 jours d'exposition sur les sites les plus contaminés. Le gradient de réponse observé suit le gradient amont aval. Quasiment absent à trois jours, le gradient de réponse s'accroît au cours de l'exposition et devient très marqué après 14 jours. Dans le cas de la Fensch, la pollution est un facteur incontestable de stress. L'hypothèse selon laquelle le gradient de réponse observé soit le reflet du gradient de pollution semble par conséquent valide. Le gradient de réponse obtenu à 14 jours suit également le gradient de température mesuré, qui traduit une augmentation de 7°C entre l'amont et l'aval.

D'autres travaux menés sur ce cours d'eau ont également mis en évidence la relation entre un gradient de réponse de biomarqueurs de stress oxydant chez le bivalve benthique *Unio tumidus* et le gradient de pollution de la Fensch (Cossu *et al.*, 1997 ; Doyotte *et al.*, 1997).

### Résumé

- La Fensch, un gradient de pollution et de température selon le profil amont aval.
- La réponse de l'activité MDMX et le taux de mortalité des dreissènes sont le reflet du gradient de perturbation.
- La variabilité de la réponse mesurée est un paramètre à intégrer dans l'interprétation des résultats.



**Figure 38 :** Localisation des sites d'étude de la Meuse aux abords de la centrale électronucléaire de Chooz (Ardennes).



## B – La Meuse (Centrale nucléaire de production d'électricité, Ardennes, 08)

### 1 – Contexte de l'étude

Cette étude a été réalisée sous forme de deux campagnes menées en juillet et octobre 1999 dans le but d'évaluer l'éventuel effet d'un traitement antialgues à base de monochloramines des circuits de refroidissement d'une centrale nucléaire de production d'électricité sur le milieu récepteur. Le traitement aux monochloramines a été effectué en juillet. L'objectif de la première campagne était d'évaluer les éventuels effets directs et à court terme de ce traitement. L'objectif de la seconde était d'évaluer la persistance d'une perturbation éventuelle après quelques mois (Etude réalisée dans le cadre du contrat EBSE-PEE et EDF-DER, 1999).

### 2 – Présentation du cours d'eau et des sites d'étude

La Meuse prend sa source en Haute Marne, traverse successivement les départements des Vosges, de la Meuse, puis des Ardennes avant de passer la frontière belge pour se jeter dans l'estuaire du Rhin au sud de Rotterdam aux Pays Bas. La portion de la Meuse étudiée aux abords de la centrale nucléaire de production d'électricité de Chooz se situe dans l'extrême nord des Ardennes, non loin de la frontière belge (Figure 38). Les données acquises au cours des suivis effectués par la BERM attribuent la note de qualité 1B\* (bonne qualité) à cette portion de la Meuse. Les sites étudiés au cours de ce travail sont répartis en amont et en aval de la centrale électronucléaire. Les distances entre les sites et la centrale sont les suivantes : Amont (500 m), Aval 1 (500 m) et Aval 2 (3 km).

---

\* Les seuils et classes de qualité établis par le Réseau National de Bassin sont référencés en annexe 1

### 3 – Analyses physico-chimiques

#### 3.1 – Dosages des composés organohalogénés adsorbables (AOX)

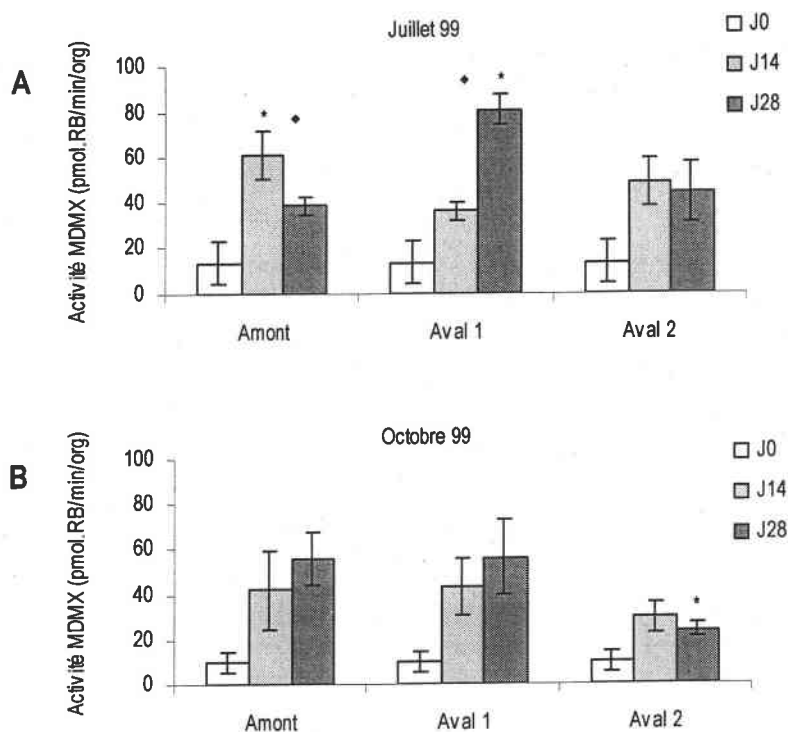
Dans la mesure où le traitement effectué par la centrale électronucléaire pouvait contenir des composés organo-halogénés et/ou favoriser leur formation dans le milieu récepteur, nous avons suivi les niveaux de composés organo-halogénés adsorbables (AOX) sur les sites d'étude. Pour cela, des prélèvements d'eau ont été effectués à chacune des dates étudiées selon le protocole décrit dans le chapitre 2.2 (§ IV).

Les résultats des dosages des composés AOX sur la portion de la Meuse étudiée ont donné des valeurs faibles, en deçà des seuils considérés comme problématiques (Hoffmann, 1986 ; RIWA, 1992). Les niveaux moyens d'AOX (exprimés en équivalents chlore) mesurés sur les trois sites lors de la campagne menée en juillet s'élèvent à 11,13 µg/L ( $\pm 0,22$ ) à J0, 8,75 µg/L ( $\pm 0,49$ ) à J14 et 10,29 µg/L ( $\pm 2,64$ ) à J28. Lors de la campagne d'octobre, les valeurs sont sensiblement les mêmes à savoir 8,3 µg/L ( $\pm 2,15$ ) à J0, 10,61 µg/L ( $\pm 1,13$ ) à J14 et 8,71 µg/L ( $\pm 0,57$ ) à J28.

#### 3.2 – Qualité physico-chimique globale

Des données physico-chimiques acquises par notre laboratoire dans le cadre d'un suivi de la Meuse dans cette zone, ainsi que certains éléments extraits des données de la BERM seront également présentés à titre de complément. Les analyses sont disponibles pour les dates J0 et J28 de la campagne de juillet et pour la date J14 de la campagne d'octobre.

L'ensemble des données recueillies, ainsi que leur interprétation en terme de qualité sont présentés dans l'annexe 6. D'un point de vue global, ces données sont cohérentes avec le diagnostic de qualité de la BERM, qui classe cette portion de la Meuse dans la catégorie 1B. Les paramètres les plus perturbés sur l'ensemble des deux campagnes sont les nitrates, les matières phosphorées, les matières en suspension, le pH et le phytoplancton caractérisé par les mesures en chlorophylle a et phéopigments. En complément, nous avons également recueilli les données fournies par la BERM sur le site de Ham sur Meuse, situé une dizaine de kilomètres en amont des sites étudiés. Ces relevés révèle la présence de micropolluants



**Figure 39 :** Evolution de l'activité MDMX chez des dreissènes dépurées pendant trois jours (J0) puis exposées dans la Meuse sur les sites Amont, Aval 1 et Aval 2 pendant 14 et 28 jours (J14 et J28) au cours de deux campagnes menées en juillet (A) et octobre (B) 1999. Toutes les activités mesurées après exposition in situ sont significativement différentes de la mesure à J0. Le symbole \* indique une différence significative entre les sites pour une date donnée ( $p < 0,05$ ). Le symbole ♦ indique une différence significative entre les dates pour un site donné ( $p < 0,05$ ).

organiques en quantité non négligeable dès l'amont de notre site d'étude (Annexe 6).

#### 4 – Suivi de l'activité MDMX

Le niveau d'activité MDMX a été mesuré chez des dreissènes dépurées pendant trois jours (J0). Ces mêmes dreissènes ont ensuite été transférées sur les sites étudiés. Les niveaux d'activité ont été contrôlés après 14 et 28 jours d'exposition *in situ* (J14 et J28).

##### 4.1 – Campagne de juillet 1999

Le niveau initial de l'activité MDMX mesuré chez les dreissènes dépurées pendant trois jours en laboratoire s'élève à 14 pmol.RB/min/org (Figure 39-A). Les activités mesurées après exposition pendant 14 et 28 jours sur les trois sites étudiés sont toutes significativement supérieures à la mesure à J0 ( $p < 0,05$ ). En effet, dès 14 jours d'exposition les niveaux d'activité ont été respectivement multipliés par 4,5, 2,6 et 3,5 chez les dreissènes transférées sur les sites Amont, Aval 1 et Aval 2. Après 28 jours d'exposition, l'activité MDMX a été significativement diminuée en Amont, alors qu'elle a continué à augmenter de manière significative ( $\times 2,25$ ) sur le site Aval 1. Sur le dernier site, l'activité s'est stabilisée au même niveau qu'à J14 (Figure 39-A).

En résumé, l'exposition des dreissènes dans la Meuse a provoqué une induction modérée sur le site Aval 2 ( $\times 3,2$  à  $3,5$ ), une induction progressive et importante sur le site Aval 1 ( $\times 6$ ) et une réaction intermédiaire sur le site Amont ( $\times 4,5$ ).

##### 4.2 – Campagne d'octobre 1999

Le niveau initial de l'activité MDMX mesuré chez les dreissènes dépurées pendant trois jours en laboratoire s'élève à 10 pmol.RB/min/org (Figure 39-B). Les activités mesurées après exposition pendant 14 et 28 jours sur les trois sites étudiés sont toutes significativement supérieures à la mesure à J0 ( $p < 0,05$ ). En effet, dès 14 jours d'exposition les niveaux d'activité ont été respectivement multipliés par 4,2, 4,3 et 2,9 chez les

dreissènes transférées sur les sites Amont, Aval 1 et Aval 2. Après 28 jours d'exposition, l'activité MDMX s'est stabilisée au même niveau qu'à J14. On observe toutefois une tendance à l'augmentation sur les sites Amont et Aval 1 et une tendance à la diminution sur le site Aval 2 (Figure 39-B).

En résumé, l'exposition des dreissènes dans la Meuse a provoqué une induction importante sur les sites Amont et Aval 1 et une induction plus modérée sur le site Aval 2.

## 5 – Bilan

L'exposition de dreissènes dans la Meuse a systématiquement provoqué une induction de l'activité MDMX aussi bien en amont qu'en aval de la centrale électronucléaire, et aussi bien en juillet qu'en octobre.

La comparaison des résultats obtenus au cours des deux campagnes montrent que les niveaux d'activité mesurés sont légèrement plus faibles en octobre qu'en juillet. Les deux campagnes ayant été effectuées à deux saisons différentes et sachant que la physiologie des animaux peut être considérablement modifiée d'une saison à l'autre en raison du cycle reproducteur, de la disponibilité en nourriture ou de la température du milieu, la comparaison directe des niveaux d'activité reste délicate. Les résultats seront donc comparés en terme d'amplitude et de profil d'induction.

Le site Aval 2 a globalement présenté un niveau de réaction modéré par rapport aux deux autres sites. L'amplitude d'induction mesurée sur ce site est restée du même ordre pour les deux campagnes (x 2,9 à 3,5). De même le profil de réaction est également resté similaire. Ainsi, l'activité a réagi jusqu'à son maximum dès J14 et s'est ensuite stabilisée.

Au contraire les sites Amont et Aval 1 ont présenté un profil d'induction variable d'une saison à l'autre. Alors qu'en octobre, l'activité mesurée sur ces deux sites semblait stabilisée dès J14, les résultats obtenus en juillet montrent une évolution de la réaction entre J14 et J28. Similaires lors de la campagne menée en octobre, les amplitudes d'induction se sont avérées plus variables en juillet.

L'ensemble de ces résultats peut être interprété en terme de perturbation du milieu. On peut ainsi émettre l'hypothèse selon laquelle les sites Amont et Aval 1 présentent une perturbation plus importante que le site Aval 2, d'une part parce qu'ils présentent globalement des niveaux d'induction plus forts et d'autre part, parce qu'ils présentent des profils de réaction moins stables. Cependant, les analyses physico-chimiques réalisées sur ce secteur ne permettent ni de détecter une perturbation notable, ni de discriminer les sites entre eux. De plus la qualité globale de la Meuse dans cette zone reste tout à fait acceptable. Il n'est par conséquent pas possible de relier directement la réaction du MDMX à un niveau de qualité de l'eau de la rivière étudiée.

En revanche, le fait que le milieu semble aussi perturbé en amont qu'en aval de la centrale et les faibles teneurs en composés AOX mesurés permettent d'exclure l'hypothèse d'un effet direct du traitement aux monochloramines des circuits de refroidissement de cette centrale électronucléaire sur le milieu récepteur. En revanche, quelle que soit l'origine de la perturbation notée sur ces deux sites, elle semble relativement ponctuelle, puisque quelques kilomètres plus en aval (Aval 2), elle apparaît réduite et l'activité MDMX réagit de manière moins importante.

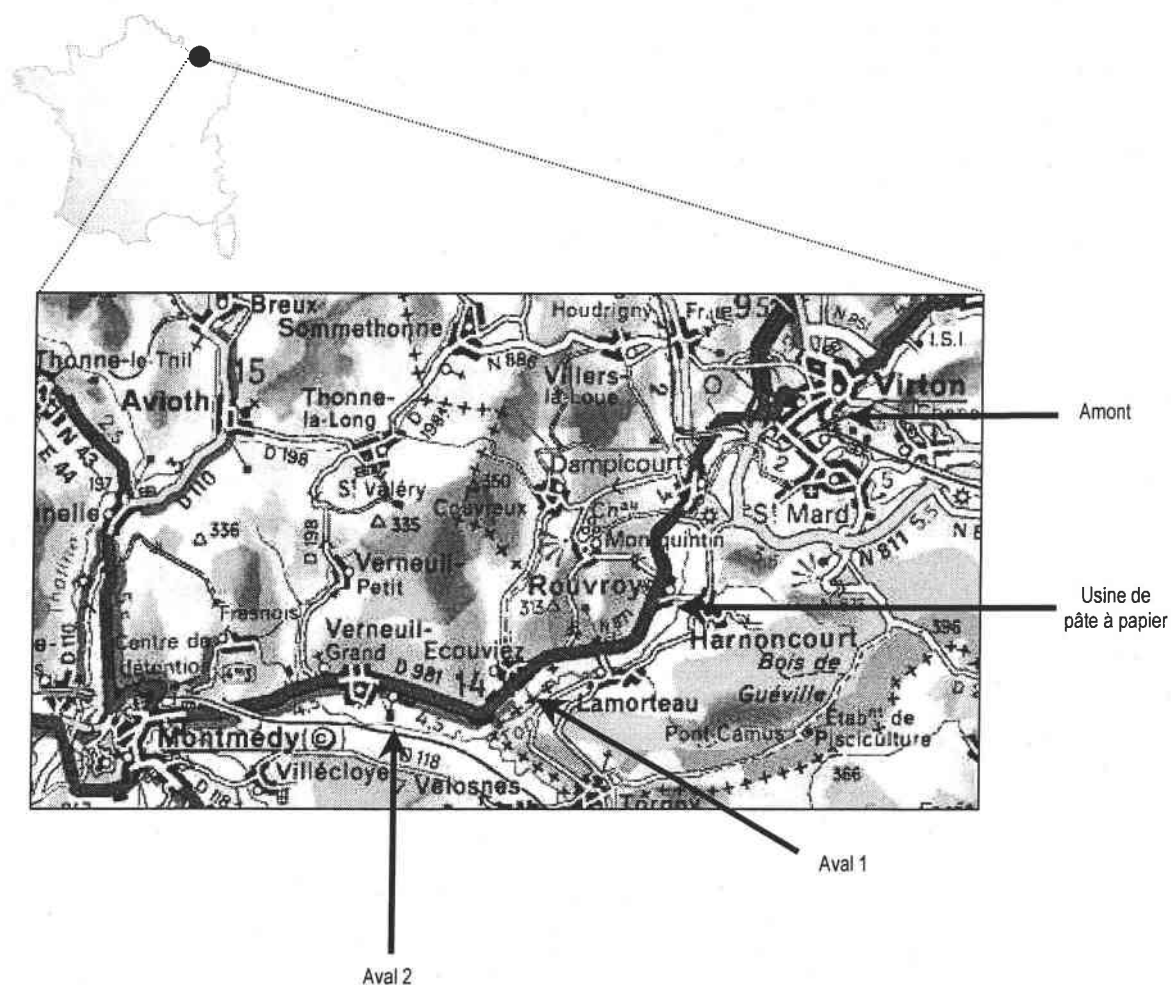
### Résumé

- L'activité MDMX est systématiquement induite après transfert *in situ*.
- L'induction mesurée est marquée en amont et en aval du rejet et apparaît plus modérée sur le site le plus aval.
- La Meuse, dans ce secteur, présente globalement une qualité physico-chimique acceptable et le traitement antialgues n'a pas eu d'impact sur le niveau d'activité MDMX.

## C – Pollution liée à l'industrie papetière

L'industrie papetière figure parmi les activités anthropiques les plus polluantes et participe à la contamination des écosystèmes, notamment en rejetant des effluents chargés en composés organo-halogénés dans les milieux aquatiques. Parmi ces composés organo-halogénés générés par les différentes étapes de la fabrication du papier, on retrouve essentiellement des composés phénoliques tels que les chlorophénols et leurs dérivés, mais également des dioxines et furanes (Hayer, 1997). Outre la pollution directe par des substances nocives, les effluents papetiers sont également responsables de la perturbation des caractéristiques physico-chimiques des milieux aquatiques, notamment en augmentant les apports en matières azotées et phosphorées (Hayer, 1997). L'importance de l'industrie papetière dans certaines régions du globe, notamment dans les pays scandinaves, a motivé la réalisation d'études visant à mieux comprendre et interpréter ses effets sur les milieux aquatiques. Ainsi, des travaux montrent la réaction de biomarqueurs d'exposition et/ou d'effets sur les espèces vivant dans ces milieux perturbés et confirment les impacts de ce type d'industrie sur les écosystèmes (Hodson *et al.*, 1992 ; Soimasuo *et al.*, 1995 ; Ahmad *et al.*, 2000 ; Chen *et al.*, 2001 ; Khan et Payne, 2002 ; Kovacs *et al.*, 2002).

Au cours de ce travail, l'effet des effluents de deux types d'industrie papetière ont été étudiés. Dans un premier temps, nous présenterons plusieurs expérimentations effectuées dans un petit cours d'eau, le Ton, qui reçoit les effluents d'une usine de fabrication de pâte à papier à blanchiment au chlore implantée sur la commune de Harnoncourt. Ces expérimentations comprennent l'étude de la réponse de l'activité MDMX chez des dreissènes exposées en laboratoire à l'eau prélevée en amont et en aval du rejet ou transférées *in situ* sur ces mêmes sites. Une étude du potentiel inhibiteur de l'eau prélevée dans le Ton complétera cette approche. Dans un deuxième temps sera présentée une étude du potentiel inhibiteur de l'eau prélevée dans la Moselle à Golbey, au niveau du rejet d'une autre papeterie qui transforme la pâte à papier fabriquée en produits finis tels que papiers et cartons.



**Figure 40 :** Localisation géographique des sites étudiés sur le cours du Ton (Frontière franco-belge).



## 1 – Induction et Potentiel Inhibiteur de l'activité MDMX à Harnoncourt (Belgique)

Les expérimentations présentées ci-dessous ont toutes été effectuées sur le Ton, qui reçoit les effluents d'une usine de pâte à papier. Ce cours d'eau et les perturbations occasionnées par cette activité industrielle ont fait l'objet de plusieurs travaux dans notre laboratoire ces dix dernières années, notamment en ce qui concerne l'impact des composés organo-halogénés sur le milieu récepteur (Hayer, 1997).

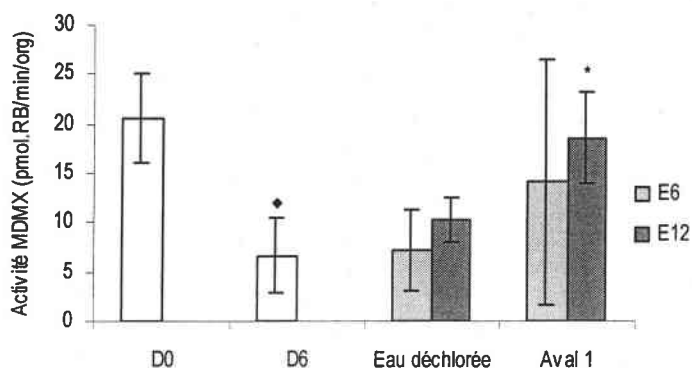
### 1.1 – Présentation du cours d'eau et des sites d'étude

Le Ton est une petite rivière belge qui se jette dans la Chiers (affluent de la Meuse) à l'extrême nord du département de la Meuse (Figure 40). Les sites choisis sont localisés sur les communes de Virton en Belgique à environ 3 km en amont du rejet (Amont), Ecouvies (Meuse ; Aval 1) et Verneuil-Grand, (Meuse ; Aval 2) respectivement situés à 5 et 10 km en aval du rejet.

Le site Aval 1, situé en aval du rejet de la papeterie est un site particulièrement dégradé. Suivi par la BERM depuis 1995, il est considéré comme présentant une pollution excessive (3 à M)\*. La qualité physico-chimique de ce site, illustrée par les valeurs moyennes et maximales relevées par la BERM sur toute la période d'étude (1999 à juillet 2002) est présentée en annexe 7. Aucune donnée concernant les micropolluants n'est disponible, mais les travaux antérieurs réalisés au sein de notre laboratoire et les dosages réalisés au cours de cette étude confirment le caractère dégradé de ce site, qui présente notamment de très fortes concentrations en AOX atteignant régulièrement des valeurs de 300 µg/L de chlore (Hayer, 1997).

Les sites Amont et Aval 2 ne sont pas suivis par la BERM, mais les travaux précédemment cités font état d'une qualité physico-chimique déjà altérée en amont et considérablement dégradée en aval, ce qui n'est pas surprenant étant donné que ce dernier site reçoit l'ensemble de la pollution drainée par la vallée.

\* Les seuils et classes de qualité établis par le Réseau National de Bassin sont référencés en annexe 1



**Figure 41 :** Evolution de l'activité MDMX chez des dreissènes dépurées pendant 6 jours (D0 et D6) en laboratoire, puis exposées à l'eau prélevée dans le Ton sur le site Aval 1 (AOX = 685 µgCl/L) pendant 6 et 12 jours (E6 et E12). Le milieu témoin est constitué d'eau déchlorée. Le symbole ♦ indique la significativité de la dépuraison pré-exposition ( $p < 0.05$ ). Le symbole \* indique une différence significative entre (i) l'activité mesurée et l'activité dépurée ( $p < 0.05$ ) et (ii) l'activité mesurée et le témoin (eau déchlorée,  $p < 0.05$ ).

## 1.2 – Exposition en laboratoire

Cette expérimentation préliminaire a consisté à exposer des dreissènes dépurées en laboratoire à un échantillon d'eau prélevée dans le Ton (Aval 1), afin d'observer la réaction de l'activité MDMX face à une contamination caractérisée par de fortes concentrations en composés organohalogénés.

### 1.2.1 – Dosage des composés organohalogénés adsorbables (AOX)

Des échantillons d'eau ont été prélevés dans le Ton en aval de la papeterie de Harnoncourt (Aval 1), pour la réalisation du dosage des AOX selon le protocole décrit dans le chapitre 2.2 (§ IV).

La concentration en AOX s'élevait à 685 µg/L de chlore. Cette valeur particulièrement forte, est une des concentrations les plus élevées qui ait été mesurée sur ce site (Hayer, 1997).

### 1.2.2 – Suivi de l'activité MDMX

#### Dépuration pré-exposition

Le niveau initial de l'activité MDMX présenté par les dreissènes a été contrôlé le lendemain du prélèvement (D0) et après 6 jours de dépuración en laboratoire (D6). Les mêmes lots d'organismes (3 lots de 5 dreissènes) ont été utilisés pour les mesures à D0 et D6.

Après 6 jours de dépuración, l'activité MDMX est significativement réduite d'un facteur 3 par rapport à l'activité initiale mesurée juste après le prélèvement (Figure 41).

#### Exposition en laboratoire

Un échantillon d'eau provenant du site Aval 1 a été prélevé pour fournir le milieu auquel ont été exposées les dreissènes en laboratoire (20L, bidon en polyéthylène).

Cinq lots de dreissènes dépurées ont ensuite été exposées pendant douze jours à 4,5 L d'eau prélevée sur le site Aval 1. Cinq autres lots de dreissènes ont été placés en eau déchlorée. Les niveaux d'activité MDMX ont été contrôlés après 6 et 12 jours d'exposition (E6 et E12). Le milieu d'exposition a été renouvelé 3 fois au cours de l'exposition. Aucune mortalité n'a été enregistrée pendant l'exposition à ces milieux et le comportement de fixation des dreissènes n'a pas été altéré par l'exposition à l'eau naturelle contaminée.

Après 6 et 12 jours d'exposition dans le milieu témoin constitué d'eau déchlorée, l'activité s'est stabilisée à son niveau basal, c'est à dire au même niveau que l'activité dépurée (Figure 41). De légères variations ont été observées, mais elles sont restées non significatives. En ce qui concerne l'exposition à l'eau naturelle provenant du site contaminé Aval 1, les résultats montrent une augmentation de l'activité MDMX dès 6 jours d'exposition en laboratoire. Cette augmentation n'était cependant pas significative par rapport à la réponse obtenue dans l'eau déchlorée en raison d'une importante variabilité. En revanche, après 12 jours d'exposition, cette variabilité s'est réduite et l'activité mesurée était 2,8 fois plus élevée que l'activité dépurée et 1,8 fois plus élevée que l'activité mesurée dans le témoin.

Ces résultats montrent que l'eau prélevée dans le Ton en aval du rejet présente un potentiel inducteur du MDMX. Parmi les facteurs susceptibles d'avoir engendré l'induction, les composés organohalogénés sont sans conteste un élément à prendre en compte. Le Ton est en effet une rivière caractérisée par une contamination importante en ces composés (Hayer *et al.*, 1996). De plus, le dosage des AOX effectué au cours de cette expérimentation confirme ce diagnostic et révèle une concentration extrêmement élevée, qui se situe bien au delà des limites acceptables à la fois pour la potabilisation de l'eau et pour le milieu récepteur, estimées entre 40 et 50 µg/L de chlore (Hoffman, 1986 ; RIWA, 1992).

Nous avons cherché à compléter ces résultats en déterminant si l'exposition des dreissènes à cette même eau, mais *in situ*, générerait également une induction.

### Résumé

- L'activité MDMX est significativement induite après 12 jours d'exposition en laboratoire à l'eau prélevée dans le Ton dont la concentration en AOX s'élève à 685 µg/L de chlore.
- Nous avons émis l'hypothèse que l'induction puisse être liée à la contamination en AOX.

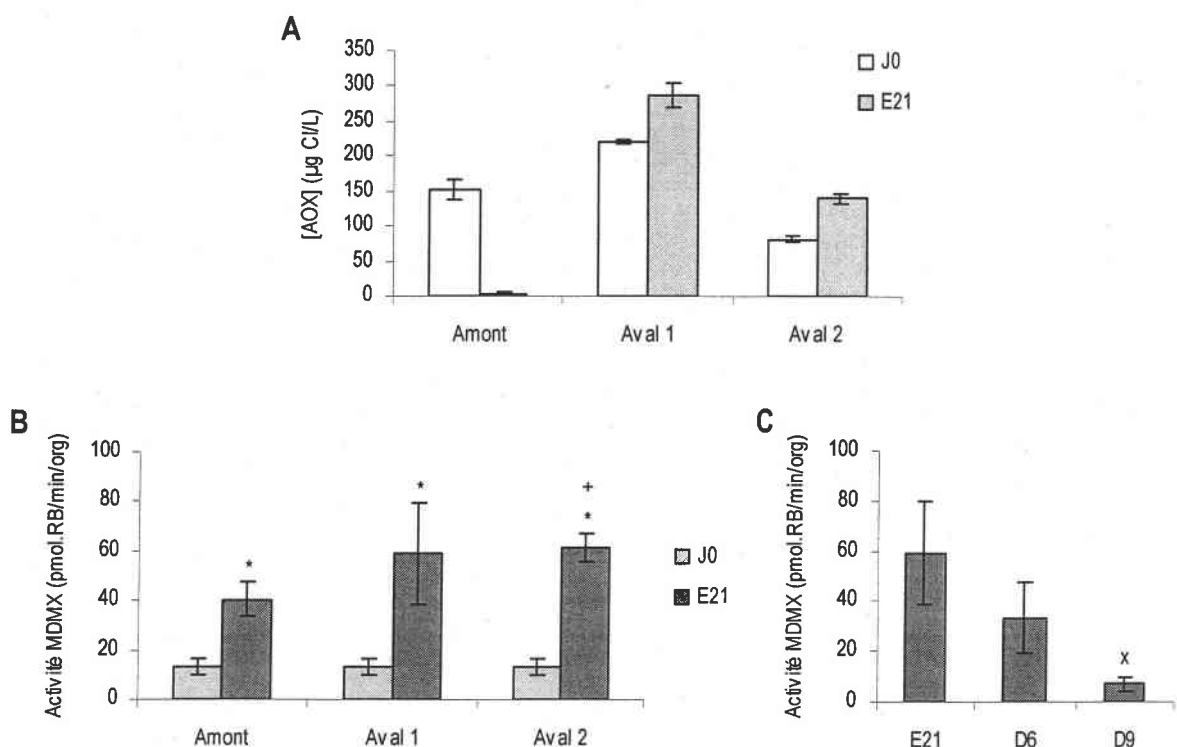
### 1.3 – Exposition *in situ*

#### 1.3.1 – Objectifs et déroulement

Les résultats de deux expérimentations *in situ* complémentaires sont présentées. La première (A, mai 1999) a consisté à étudier la réponse de l'activité MDMX chez des dreissènes transférées sur les trois sites présentés précédemment (Amont, Aval 1 et Aval 2) pendant 21 jours et à suivre la dépuración post-exposition en laboratoire. Les résultats obtenus ont ensuite été confirmés et précisés au cours d'une seconde expérimentation *in situ* (B, mai 2000), pour laquelle l'activité MDMX a été suivie chez des dreissènes transférées sur les sites Amont et Aval 1 pendant 3, 14 et 21 jours, puis dépurées en laboratoire.

Des échantillons d'eau ont été prélevés sur les sites étudiés pour la réalisation de dosages des composés organo-halogénés (AOX) (Expérimentations A et B) et d'analyses physico-chimiques (Expérimentation B) selon le protocole décrit dans le chapitre 2.2 (§ IV).

Le niveau d'activité MDMX présenté par les dreissènes après 4 jours (A ; 3 lots de 5 dreissènes) ou 6 jours (B ; 6 lots de 5 dreissènes) de dépuración a été contrôlé (J0). Les dreissènes ont ensuite été transférées sur les deux ou trois sites étudiés le long du Ton. Les dreissènes ont été exposées sur ces sites pendant 21 jours (E21) pour l'expérimentation A et 3, 14 et 21 jours (E3, E14 et E21) pour l'expérimentation B. A chacune de ces dates, quinze dreissènes ont été prélevées dans les cages et ramenées au laboratoire dans l'eau de leur site d'origine. La mesure de l'activité MDMX a été effectuée dès le lendemain à partir de trois lots de 5 dreissènes. Les organismes provenant des sites Aval 1 (A) ou Amont et Aval 1 (B), et utilisés pour la mesure à E21 ont été remplacés en eau déchlorée, afin de suivre l'évolution de l'activité MDMX après arrêt de l'exposition. Les niveaux d'activité MDMX ont été contrôlés après 6 et 9 jours de dépuración (D6 et D9) pour l'expérimentation A et après 8 et 12 jours de dépuración (D8 et D12) pour l'expérimentation B.



**Figure 42 : Induction in situ – Expérimentation A (mai 1999).**

**A :** Evolution des concentrations en AOX, exprimées en µg/L de chlore, dans l'eau des trois sites étudiés au cours de l'expérimentation A.

**B :** Evolution de l'activité MDMX chez des dreissènes dépurées pendant 3 jours (J0) en laboratoire, puis implantées dans le Ton sur les sites Amont, Aval 1 et Aval 2 pendant 21 jours (E21). Le symbole \* indique une différence significative par rapport à l'activité dépurée mesurée à J0 ( $p < 0.05$ ). Le symbole + indique une différence significative par rapport à l'activité mesurée sur le site Amont ( $p < 0.05$ ).

**C :** Evolution de l'activité MDMX chez les dreissènes implantées pendant 21 jours sur le site Aval 1 (E21), puis replacées en eau déchlorée au laboratoire pendant 6 et 9 jours (D6 et D9). Le symbole x indique la significativité de la dépuración post-exposition ( $p < 0.05$ ).

### 1.3.2 – Expérimentation A

#### Dosage des composés organohalogénés adsorbables (AOX)

Le dosage des composés organohalogénés adsorbables (AOX) réalisé au cours de cette étude montre la présence de ces composés sur l'ensemble du linéaire étudié, même en amont du rejet de la papeterie (Figure 42-A). Le jour du transfert, les concentrations en AOX (exprimées en équivalents chlore) atteignent 150µg/L en amont, 220µg/L sur le site Aval 1 et 81µg/L sur le site Aval 2. Après la période d'exposition de 21 jours, les AOX ont à nouveau été dosés et les résultats confirment la dégradation des deux sites Aval 1 et 2 concernant ce paramètre (287 et 139µg/L respectivement). En effet, ces valeurs sont toutes largement supérieures à 50µg/L, seuil au delà duquel les AOX exercent un impact important sur le milieu (Hoffman, 1986 ; RIWA, 1992). En revanche, la concentration en AOX mesurée sur le site Amont est négligeable (3µg/L).

#### Activité MDMX

L'activité mesurée chez les dreissènes dépurées juste avant le transfert sur le terrain est de l'ordre de 13 pmol.RB/min/org (Figure 42-B). Après 21 jours d'exposition sur les sites naturels, l'activité est induite sur les trois sites. Elle est multipliée par 3 en amont du rejet, par 4,5 sur le site Aval 1 et par 4,7 sur le site Aval 2 (Figure 42-B). La différence entre l'activité mesurée après 21 jours d'exposition sur le site Aval 1 et celles mesurées sur les 2 autres sites n'est pas significative en raison d'un écart-type assez important. En revanche, l'activité mesurée sur le site Aval 2 est significativement supérieure à celle mesurée en amont.

Après cette période d'exposition, les dreissènes exposées sur le site Aval 1 ont été placées en eau déchlorée. Après 6 jours de dépuración en laboratoire, la diminution de l'activité n'était pas significative. En revanche, après 9 jours l'activité a significativement diminué par rapport à 6 jours et a retrouvé un niveau basal équivalent à celui mesuré à J0 (Figure 42-C).

## Bilan de l'expérimentation A

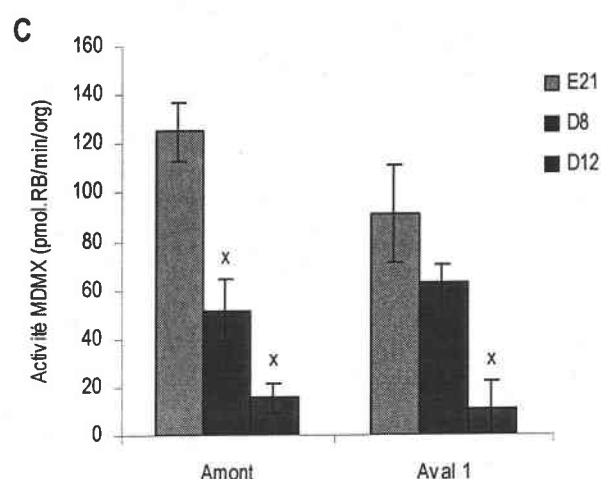
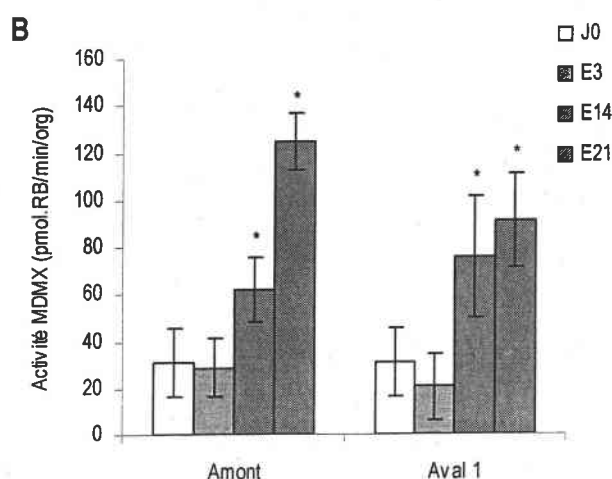
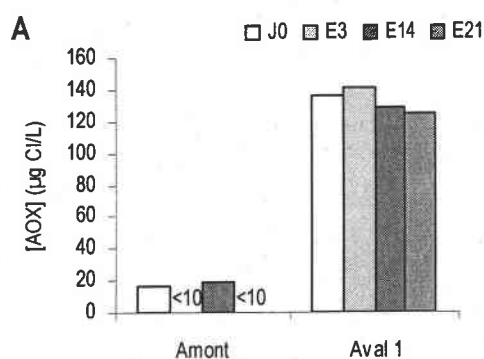
Cette expérimentation a permis de montrer une induction significative de l'activité MDMX chez des dreissènes exposées *in situ* à de fortes concentrations en AOX. La réaction, déjà marquée en amont du rejet, est toutefois plus importante en aval (Aval 1 et 2), où les concentrations en AOX sont très élevées, même quelque 10 km en aval du rejet.

Les données collectées pour le paramètre AOX sur le site Amont montrent que ce site présente une qualité altérée, et que sa position « amont » ne sous-entend pas qu'il soit de bonne qualité. En effet, des travaux antérieurs réalisés dans notre laboratoire ont déjà observé ponctuellement de très fortes concentrations en AOX en amont du rejet, qui ont été expliquées par le déversement sauvage d'effluents au niveau ou en amont du site étudié. Cette hypothèse reste toutefois difficile à vérifier, mais la chute conséquente des niveaux d'AOX à E21 appuie l'hypothèse d'une contamination ponctuelle. Toutefois, on ne peut exclure la présence de ces composés sur au moins une partie du suivi, et, par conséquent, on ne peut exclure leurs éventuels effets sur les dreissènes encagées. Ces observations soulignent que le gradient amont aval étudié ici ne saurait correspondre à un gradient de pollution par les AOX, étant donné les valeurs très importantes mesurées sur les trois sites au début de l'expérimentation. Pour ces raisons, l'hypothèse selon laquelle les composés organohalogénés puissent participer à l'induction obtenue sur ces sites ne peut être exclue.

L'induction observée s'est avérée réversible puisque la cessation de l'exposition permet à l'activité de retrouver son niveau basal.

Etant donné que ces résultats n'ont pas permis de conclure clairement sur la participation éventuelle des AOX à l'induction du MDMX, nous avons renouvelé cette expérimentation en se focalisant sur les sites Amont et Aval 1 et en tentant de préciser la cinétique d'induction de l'activité MDMX. Les dosages d'AOX ont été complétés par des analyses physico-chimiques.





**Figure 43 : Induction in situ – Expérimentation B (mai 2000).**

**A :** Evolution des concentrations en AOX, exprimées en  $\mu\text{g/L}$  de chlore, dans l'eau des deux sites étudiés au cours de l'expérimentation B.

**B :** Evolution de l'activité MDMX chez des dreissènes dépurées pendant 3 jours (J0) en laboratoire, puis implantées dans le Ton sur les sites Amont et Aval 1 pendant 3, 14 et 21 jours (E3, E14 et E21). Le symbole \* indique une différence significative par rapport à l'activité dépurée mesurée à J0 ( $p < 0.05$ ).

**C :** Evolution de l'activité MDMX chez les dreissènes implantées pendant 21 jours sur le site Aval 1 (E21), puis replacées en eau déchlorée au laboratoire pendant 8 et 12 jours (D8 et D12). Le symbole x indique la significativité de la dépuración post-exposition ( $p < 0.05$ ).

### 1.3.3 – Expérimentation B

#### Dosage des composés organohalogénés adsorbables (AOX) et Analyses physico-chimiques

Contrairement à l'expérimentation A, les concentrations en AOX mesurées montrent une différence nette entre les deux sites étudiés, situés en amont et en aval (Aval 1) du rejet de la papeterie (Figure 43-A). En amont, les niveaux d'AOX (exprimés en équivalents chlore) sont restés inférieurs à 20µg/L aux quatre dates étudiées pendant l'expérimentation. D'après Hoffmann (1986) qui a établi des grilles de qualités pour le paramètre AOX, ces niveaux résultent d'une influence industrielle modérée sur le milieu. En aval du rejet (Aval 1), les niveaux ont oscillé entre 125 et 140µg/L. Ces concentrations très importantes font état d'une influence industrielle marquée sur le milieu et sont 2,5 à 3 fois supérieures au seuil maximal défini pour la potabilisation de l'eau par la RIWA (1992).

Le détail des analyses physico-chimiques réalisées en parallèle au dosage des AOX est présenté en annexe 7. Les données concernant l'oxygène dissous et les matières organiques oxydables (DBO<sub>5</sub>, DCO, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> et N Kjeldhal) font état d'une perturbation significative aussi bien en amont qu'en aval du rejet. La DCO augmente de manière significative sur le site Aval 1 entre J0 et E21. Les valeurs obtenues pour la DBO<sub>5</sub> et l'azote Kjeldhal sont globalement assez élevées, surtout en amont à J0. Les paramètres pris en compte pour l'évaluation des matières azotées font également état d'une altération significative des deux sites étudiés. Les mesures de phosphore total montrent une altération nettement plus marquée en amont qu'en aval du rejet. De la même manière les niveaux de matières en suspension sont très élevés sur les deux sites, mais la valeur la plus forte a été mesurée à J0 en amont du rejet. La conductivité augmente entre l'amont et l'aval, principalement en raison d'une augmentation des niveaux en chlorures, sulfates et sodium. Les valeurs de pH mesurées s'échelonnent entre 7,8 et 8,2. En amont, le pH a diminué de 0,4 unités entre J0 et E21. Les températures mesurées en aval du rejet sont supérieures de 2,4 à 3,8°C par rapport à celles mesurées en amont pendant la période étudiée.

En conclusion, l'ensemble du linéaire présente une qualité physico-chimique dégradée, aussi bien en amont qu'en aval du rejet. Les résultats obtenus pour le site Aval 1 sont en adéquation avec les conclusions des suivis opérés par la BERM dans cette zone.

## Activité MDMX

L'activité MDMX mesurée chez les dreissènes dépurées juste avant le transfert sur le terrain était de l'ordre de 30 pmol.RB/min/organisme (Figure 43-B). Après 3 jours d'exposition sur les sites naturels, aucune modification de l'activité n'a été observée sur les deux sites. Après 14 jours, l'activité était significativement induite (respectivement x2 et x2,5) en amont et en aval. La différence entre les activités mesurées après 14 jours d'exposition sur les deux sites n'est pas significative en raison d'un écart-type assez important en aval. Entre 14 et 21 jours d'exposition, l'activité a été multipliée par deux en amont du rejet, alors qu'elle a été légèrement augmentée en aval (différence E14/E21 non significative). Cependant, la différence entre les activités mesurées à E21 sur les deux sites n'est pas significative, toujours en raison d'un écart-type assez important pour le site Aval 1 (Figure 43-B).

Après cette période d'exposition, les dreissènes prélevées sur les sites Amont et Aval 1 ont été placées en eau déchlorée. Après 8 jours de dépuración en laboratoire, l'activité a diminué de manière non significative chez les dreissènes provenant du site Aval 1, et de manière significative chez les dreissènes provenant du site Amont. Après 12 jours, l'activité mesurée chez toutes les dreissènes était significativement réduite par rapport à 8 jours et a retrouvé un niveau basal, c'est à dire un niveau équivalent à celui mesuré à J0 (Figure 43-C).

## Bilan de l'expérimentation B

Une induction significative de l'activité MDMX a été mesurée dès 14 jours en amont comme en aval du rejet et cette induction s'est confirmée après 21 jours d'exposition *in situ*. Les niveaux d'induction atteints sur les deux sites sont similaires aussi bien après 14 jours qu'après 21 jours d'exposition.

Les concentrations en AOX mesurées sur ces sites, négligeables en amont et élevées en aval du rejet, ne suffisent pas à expliquer l'induction de l'activité MDMX chez les dreissènes exposées *in situ*. Finalement, même si on peut légitimement penser que les AOX puissent participer au déclenchement du processus d'induction lorsqu'ils sont présents (en aval), il apparaît clair que d'autres facteurs interviennent dans la mesure où une

induction a pu être obtenue en leur absence (en amont). Parmi les facteurs susceptibles d'induire la défense MDMX, on peut retenir la mauvaise qualité générale du cours d'eau. En effet, les analyses physico-chimiques réalisées ont montré une dégradation importante aussi bien en amont qu'en aval du rejet, mise en évidence notamment par des niveaux élevés en matières organiques, en MES et phytoplancton, qui sont des facteurs susceptibles d'interagir avec le MDMX.

L'induction observée s'est avérée réversible puisque la cessation de l'exposition permet à l'activité de retrouver son niveau basal.

### Résumé

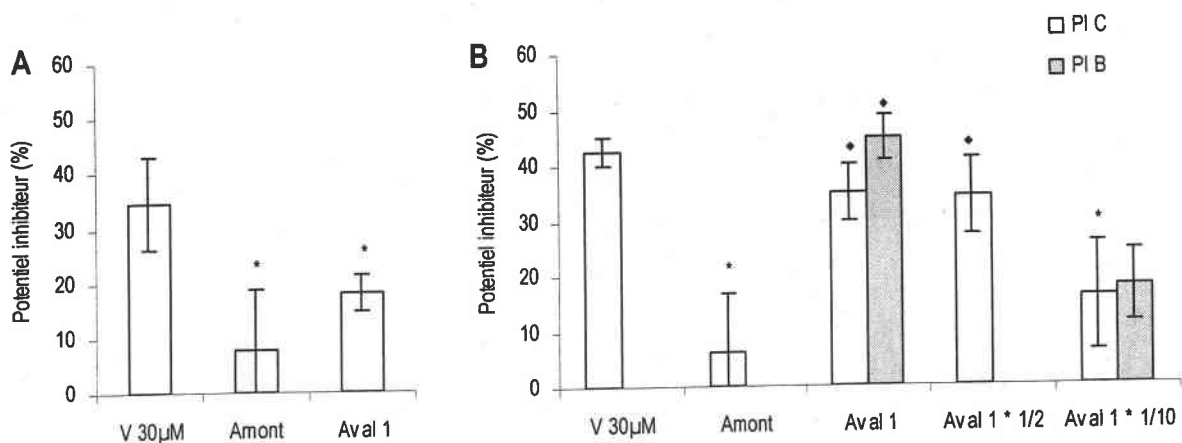
- L'induction de l'activité MDMX est marquée en amont et en aval du rejet, sans qu'elle puisse être corrélée aux niveaux d'AOX mesurés. L'induction ne peut donc pas être attribuée à ces composés.
- On peut émettre l'hypothèse que la contamination générale du cours d'eau participe à la réaction d'induction.

## 1.4 – Potentiel inhibiteur

### 1.4.1 – Objectifs et déroulement

Les résultats précédemment présentés ont montré que la réponse du MDMX n'était pas reliée au témoin de contamination choisi, à savoir, le niveau d'AOX. Nous avons donc cherché à relier la réponse obtenue à un paramètre plus global en évaluant par la mesure du potentiel inhibiteur (PI), la présence de composés substrats du MDMX dans l'eau du Ton. La première démarche entreprise a consisté à mesurer le PI de l'eau prélevée en amont et en aval du rejet de la papeterie (PI A). Cette mesure a par la suite été complétée par l'évaluation du PI de l'eau prélevée en aval diluée au 1/10 (PI B). Enfin, les résultats ont été confirmés et précisés en testant une dilution au 1/2 de cette eau contaminée (PI C).

Les échantillons d'eau utilisés pour la mesure du potentiel inhibiteur ont été prélevés dans le Ton pendant le mois de mai 1999, parallèlement à l'expérimentation *in situ* A. La mesure du potentiel inhibiteur a été effectuée avec des dreissènes acclimatées pendant trois jours en laboratoire selon le protocole décrit dans le chapitre 2.2 (§ II-B ; PI A & B,  $n \leq 3$  ;



**Figure 44** : Potentiel inhibiteur des eaux prélevées sur le cours du Ton en amont et en aval (Aval 1) de la papeterie de Harmoncourt (A). Des dilutions au 1/2 et 1/10 de l'eau Aval 1 ont également été testées (B). Le symbole \* indique une différence significative par rapport au PI du vérapamil ( $p < 0.05$ ). Le symbole ♦ indique une différence significative par rapport au PI mesuré pour l'eau des sites Amont et Aval 1\*1/10 ( $p < 0.05$ ).

PI C, n>3). Le PI des eaux naturelles a été comparé à celui du vérapamil lors de deux mesures (PI A & C). Le tableau ci-dessous présente les eaux et/ou les dilutions utilisées pour chaque mesure.

	Amont	Aval 1	Aval 1*1/2	Aval 1*1/10
PI A	X	X		
PI B		X		X
PI C	X	X	X	X

### 1.4.2 – Mesure PI A

Le PI du vérapamil a été évalué à 35%. Les deux eaux naturelles testées présentent un PI significativement inférieur à celui du vérapamil, de l'ordre de 8% et 18% pour les eaux prélevées respectivement en amont et en aval du rejet (Figure 44-A). Le PI mesuré en aval est plus élevé que celui mesuré en amont, mais la différence observée n'est pas significative, principalement en raison d'un écart-type important pour la mesure Amont dû à une valeur de PI négative. L'obtention d'un PI négatif correspond à un artefact de calcul et signifie que l'eau testée n'a pas exercé d'inhibition significative sur l'efflux de RB au cours de la mesure.

### 1.4.3 – Mesure PI B

Le PI mesuré à partir de l'eau prélevée en aval du rejet s'est élevé à 45%. Sa dilution au 1/10 présentait un PI significativement inférieur, de l'ordre de 18% (Figure 44-B).

### 1.4.4 – Mesure PI C

Le PI du vérapamil a été évalué à 43%. Le résultat obtenu pour l'eau prélevée en amont du rejet (6%) est du même ordre que celui évalué lors de la mesure PI A, et de la même manière, il présente une grande variabilité due à l'obtention d'une valeur négative (Figure 44-B). Comme précédemment, une différence significative est obtenue entre les PI

mesurés pour l'eau prélevée en aval (35%) et sa dilution au 1/10 (16%). Etonnamment, la dilution au 1/2 de cette même eau présente un PI voisin de l'eau native (34%).

#### 1.4.5 – Synthèse des résultats du PI

L'ensemble des résultats présentés précédemment a montré que les PI les plus faibles ont systématiquement été obtenus à partir de l'eau du site Amont et de la dilution au 1/10 de l'eau du site aval, ce qui signifie que ces deux eaux présentent la charge organique substrat la plus faible. Le fait qu'elles aient exercé un effet inhibiteur similaire souligne qu'il est nécessaire de diluer l'eau du site Aval 1 par 10 pour obtenir la même charge substrat qu'en amont. Le raisonnement inverse amène donc à penser que l'impact du rejet de la papeterie revient à multiplier par 10 la charge organique substrat du MDMX entre l'amont et l'aval. Cependant, cette hypothèse n'est valable que si la relation entre la charge substrat et l'effet inhibiteur est linéaire, ce qui ne semble pas être le cas dans la mesure où la dilution au 1/2 de l'eau du site Aval 1 n'a pas engendré en conséquence une diminution du PI. En revanche, une dilution au 1/10 l'a réduit d'un facteur 2 seulement.

Une dilution au 1/2 de l'eau prélevée en aval du rejet de la papeterie ne suffisant pas à réduire le PI par rapport à celui de l'eau native, on peut considérer que la quantité de composés substrats présents dans cette eau, même diluée, est capable de provoquer l'inhibition maximale du MDMX, mettant en évidence le phénomène de saturation des capacités du MDMX.

En outre, ces résultats montrent également que l'induction de l'activité MDMX, qui était du même ordre aussi bien en amont qu'en aval du rejet, ne peut être reliée à la mesure des PI de ces eaux, qui se sont avérés significativement différents.

#### Résumé

- La relation entre l'effet inhibiteur mesuré et la charge organique substrat n'est pas linéaire
- Une dilution au 1/2 de l'eau du site Aval 1 ne suffit pas à réduire le PI, traduisant probablement la saturation des capacités du système MDMX.
- L'induction précédemment mesurée sur les sites d'étude ne peut être reliée aux PI des eaux

## 1.5 – Analyse globale : système MDMX et qualité du Ton

L'exposition en laboratoire à l'eau du site Aval 1, fortement contaminée par les AOX a provoqué une induction significative de l'activité MDMX en 12 jours. Les deux expérimentations *in situ* ont également montré une induction significative de l'activité MDMX en amont comme en aval du rejet étudié. Cette induction est apparue dès 14 jours d'exposition et s'est maintenue jusqu'à 21 jours. Après cessation de l'exposition, l'activité MDMX retrouve un niveau basal équivalent à celui mesuré avant transfert des organismes sur le terrain. L'ensemble des résultats montre que le système MDMX est capable de refléter la dégradation (induction) et, au contraire l'amélioration (dépuración) des conditions environnementales.

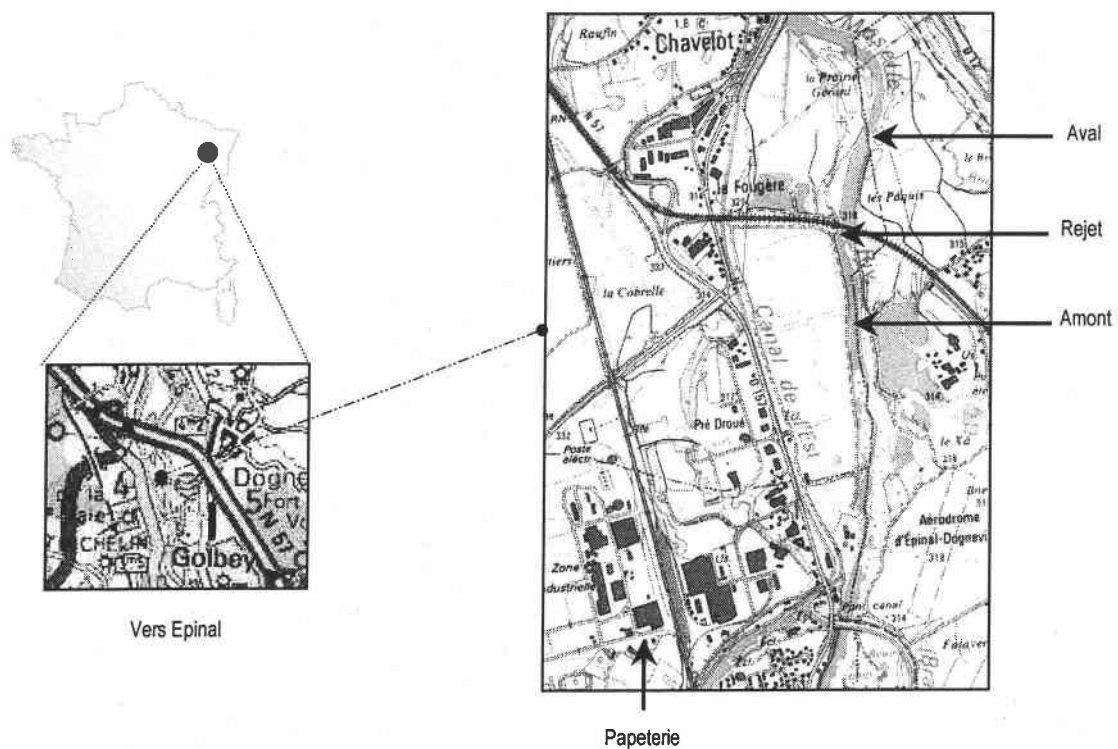
Parmi les facteurs susceptibles d'induire l'activité MDMX, figurent les composés organiques, qu'ils soient d'origine naturelle ou anthropique. Etant donné le type de rejet étudié dans le cas du Ton, le paramètre AOX a été choisi en tant que témoin de contamination d'origine anthropique. Il s'est cependant avéré que la réponse du MDMX n'était pas reliée à ce paramètre spécifique. L'étude du potentiel inhibiteur, en évaluant la présence de composés substrats, permet de disposer d'un paramètre plus global. Ces travaux ont révélé la présence d'une charge organique substrat beaucoup plus importante en aval qu'en amont du rejet, alors que l'induction du MDMX était du même ordre sur ces deux sites. La réponse du MDMX n'a donc pas pu être reliée à ce paramètre.

Finalement, le seul élément dont nous disposons pour expliquer l'induction observée sur l'ensemble du linéaire étudié, se révèle être la qualité physico-chimique globale du cours d'eau, très médiocre (forte contamination organique) selon les critères définis par la BERM, et qui peut probablement expliquer l'induction observée.

### Résumé

- L'eau du Ton a provoqué une induction du MDMX similaire en amont et en aval du rejet.
- L'induction n'a pu être reliée, ni à la présence de composés organohalogénés, ni à la présence d'une charge substrat globale.
- La mauvaise qualité physico-chimique globale a pu favoriser cette induction.





**Figure 45 :** Localisation des sites d'étude du potentiel inhibiteur de la Moselle à Golbey (Vosges).

## 2 – Potentiel Inhibiteur de la Moselle à Golbey (Vosges, 88)

### 2.1 - Présentation du cours d'eau et des sites d'étude

Trois sites localisés sur la commune de Golbey (Vosges, 88) et distants de quelques centaines de mètres ont été étudiés sur la Moselle (Figure 45). Sur la zone étudiée, la Moselle coule aux abords de sites industriels et urbains. Elle se situe en aval de l'agglomération d'Epinal et aux abords d'un axe routier important, de gravières et d'une papeterie. Les sites étudiés sont répartis comme suit :

- Amont : 250 mètres avant le rejet de la papeterie
- Rejet : au niveau du rejet de la papeterie
- Aval : 250 mètres après le rejet

Cette zone de la Moselle est régulièrement suivie par la BERM depuis 1993 et les résultats de ce suivi la classe parmi les sites de bonne qualité (1B)\*. Aucune donnée n'est disponible en ce qui concerne l'éventuelle présence de micropolluants.

### 2.2 – Déroulement

L'étude du potentiel inhibiteur de l'eau prélevée sur ces trois sites a été effectuée à trois dates réparties sur deux saisons de l'année 2000 : deux dates au printemps (avril et mai) et une en automne (novembre). A chacune de ces dates, des échantillons d'eau destinés à la mesure du potentiel inhibiteur, à la réalisation d'analyses physico-chimiques (avril et mai) et au dosage des composés organo-halogénés adsorbables (AOX, mai) ont été prélevés et traités selon le protocole décrit dans le chapitre 2.2 (§ II-B-2 et IV). Douze lots de dreissènes acclimatées pendant 5 à 7 jours en laboratoire ont été utilisés pour l'étude du potentiel inhibiteur selon le protocole décrit dans le chapitre 2.2 (§ II-B-3). Le potentiel inhibiteur du vérapamil a été mesuré à titre de témoin.

---

\* Les seuils et classes de qualité établis par le Réseau National de Bassin sont référencés en annexe 1

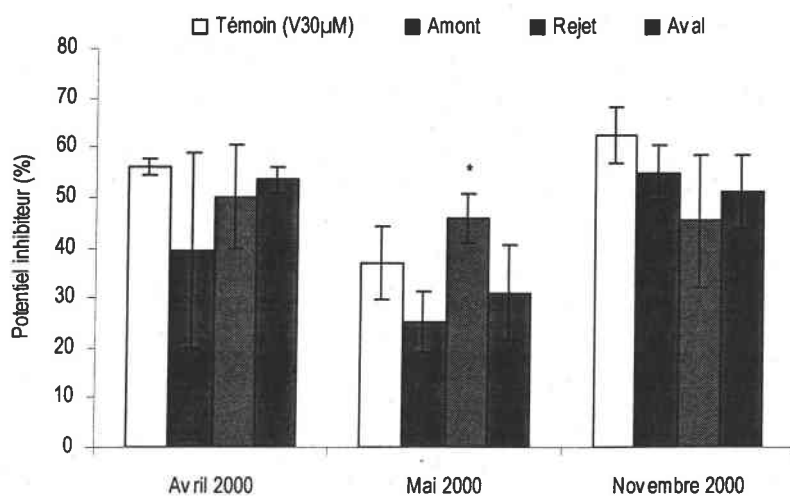
## 2.3 – Analyses physico-chimiques et dosage des AOX

### 2.3.1 – Analyses physico-chimiques (avril et mai)

Les analyses physico-chimiques détaillées sont présentées en annexe 8. Les données concernant l'oxygène dissous et les matières organiques et oxydables ( $\text{DBO}_5$ , DCO,  $\text{NH}_4^+$  et N Kjeldhal) ne font état d'aucune perturbation notable, excepté pour la DCO qui présente des valeurs plus importantes au niveau du rejet. Les paramètres pris en compte pour l'évaluation des matières azotées et des nitrates ne présentent pas d'altération significative au niveau du rejet par rapport aux deux autres sites. Les mesures de phosphore total montrent une légère altération sur tout le linéaire étudié. Les niveaux de matières en suspension augmentent entre avril et mai, et présentent les valeurs les plus élevées à partir du rejet. La Moselle à Golbey est une rivière peu minéralisée présentant une conductivité très faible, qui s'avère cependant être plus importante au niveau du rejet. L'ensemble de la zone présente une carence en calcium. Les valeurs de pH mesurées s'échelonnent entre 6,9 et 7,8 et sont plus élevées au niveau du rejet. Malgré une altération (qui reste toutefois modérée) de certains paramètres au niveau du rejet, l'ensemble du linéaire présente une qualité physico-chimique tout à fait convenable (Annexe 8), ce qui est en adéquation avec les résultats des suivis opérés par l'Agence de l'eau dans cette zone.

### 2.3.2 – Dosages des composés organohalogénés adsorbables (AOX, mai)

Le dosage des composés AOX révèle un profil atypique : les valeurs relevées en amont et en aval du rejet se situent autour de la valeur seuil de  $50\mu\text{g/L}$  de chlore, qui caractérise un milieu dégradé. En revanche, l'eau prélevée dans le rejet présente des valeurs inférieures à  $10\mu\text{g/l}$  (Hoffman, 1986 ; RIWA, 1992).



**Figure 46 :** Potentiel inhibiteur, exprimé en pourcentage, des eaux prélevées dans la Moselle en amont et en aval du rejet d'une papeterie (Amont, Rejet, Aval) à trois périodes de l'année 2000 (avril, mai et novembre). Le PI du vérapamil est présenté à titre de témoin. Le symbole \* indique une différence significative entre les PI mesurés pour chaque site ( $p < 0,05$ ).

## 2.4 – Mesure du potentiel inhibiteur (avril, mai et novembre)

### 2.4.1 – Potentiel inhibiteur du vérapamil

Le potentiel inhibiteur du vérapamil a été évalué à 56% en avril, 37% en mai et 62% en novembre (Figure 46).

### 2.4.2 – Potentiel inhibiteur des eaux de la Moselle

En avril, le potentiel inhibiteur moyen mesuré sur les trois sites tend à augmenter selon le gradient amont aval mais cette évolution n'est pas significative (Figure 46). Alors qu'il tend à rester inférieur à celui du vérapamil en amont, le PI atteint le niveau du vérapamil à partir du rejet. En mai, le PI mesuré au niveau du rejet est supérieur à celui exercé par le vérapamil et se distingue significativement des deux autres sites. En novembre, aucune différence entre les PI mesurés pour les trois eaux naturelles n'est observée. Ils sont tous équivalents au PI du vérapamil (Figure 46).

## 2.5 – Bilan

Les valeurs de PI mesurées pour le vérapamil se sont avérées variables selon les dates étudiées. Des travaux ont suggéré que la sensibilité à cet inhibiteur pouvait différer selon l'état d'induction du système MDMX chez les organismes considérés (Kurelec, 1995 ; Kurelec *et al.*, 1995). Dans notre cas, les différences de PI mises en évidence pour le vérapamil peuvent s'expliquer par des variations naturelles des niveaux d'activité MDMX chez les dreissènes provenant de La Maxe (Chapitre 3.2 § III). Il n'est par conséquent pas envisageable de comparer directement les résultats obtenus ici à des dates différentes. En revanche, la mesure du PI du vérapamil constitue un témoin d'inhibition valide au sein d'une même expérimentation et permet de raisonner en profil d'inhibition.

Globalement, les résultats obtenus par la mesure du PI ne permettent pas de discriminer significativement les sites étudiés selon leur charge substrat. Les différences observées ne sont en effet significatives qu'à une seule date (mai). Connaissant la qualité acceptable de

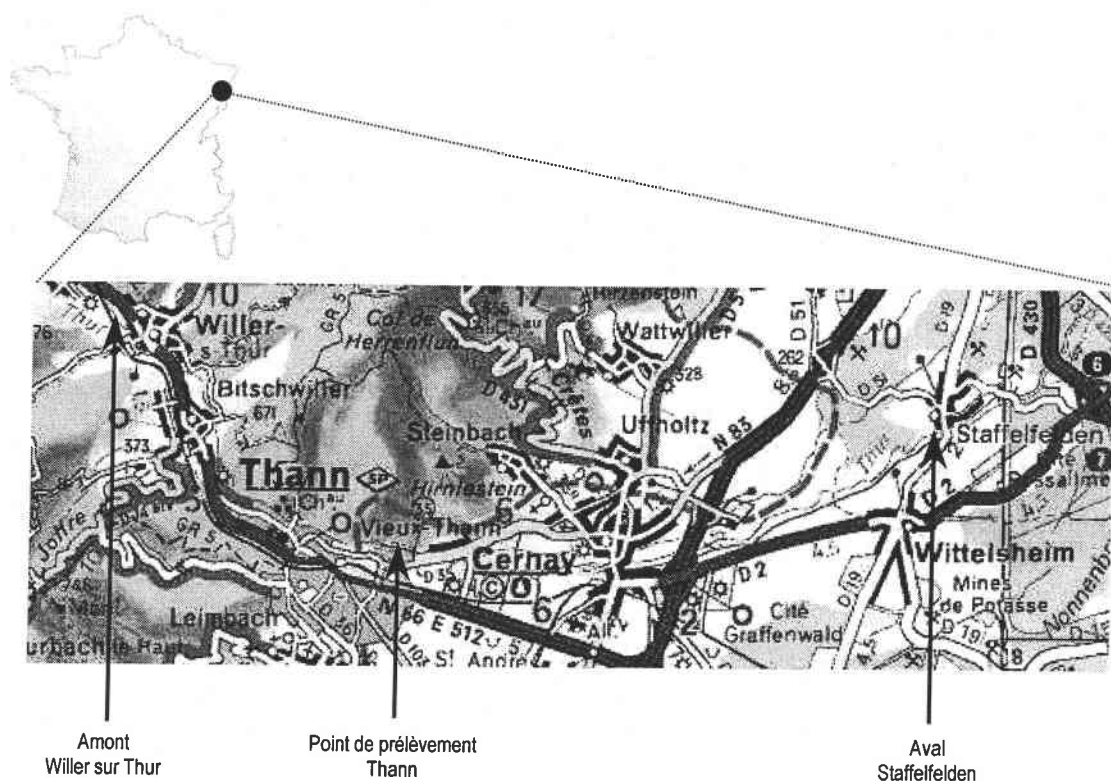
cette zone de la Moselle, un doute subsiste quant à l'origine de cette absence de significativité : est-ce le test du PI qui n'est pas suffisamment sensible pour discriminer ces sites ou est-ce la charge organique des eaux qui est relativement homogène et donc n'est pas révélée lors de la mesure du PI ?

On peut toutefois constater que le site localisé au niveau du rejet présente systématiquement un PI parmi les plus élevés et qui s'est avéré constant (45 à 50%) sur les trois périodes étudiées, ce qui permet d'avancer l'hypothèse de la présence sur ce site d'une charge substrat plus constante que dans le cas des deux autres sites. Les PI mesurés en amont et en aval sont globalement assez élevés, mais moins stables que ceux mesurés au niveau du rejet. Les charges organiques présentes sur ces sites sont probablement soumises à des variations liées à des phénomènes de concentrations ou de dilution des apports (modulations des rejets occasionnés par les activités humaines, rejets ponctuels et/ou accidentels, épisodes de précipitations, crues).

Une étude effectuée en parallèle dans notre laboratoire au mois de mai a également montré un effet du rejet sur les biomarqueurs cytologiques mesurés (Ledy, 2002). Des lymnées (mollusques gastéropodes) et des unios (mollusques bivalves) ont été transférés sur ces sites pendant 21 jours. Les résultats ont montré une perturbation du système lysosomal au niveau du rejet, et également au niveau du site aval dans le cas des unios. La réaction de ces marqueurs cellulaires est cohérente avec les résultats obtenus par la mesure du PI des eaux prélevées sur ces sites, indiquant la présence de contaminants principalement sur le site du rejet.

#### Résumé

- La mesure du potentiel inhibiteur a mis en évidence la présence de composés substrats du MDMX sur le linéaire étudié ; cependant, il n'a pas été possible de discriminer les sites sur la base de ce critère.
- Les conséquences possibles de la présence des composés substrats sont :
  - Induction du système MDMX
  - Saturation et inhibition du MDMX, s'ils sont présents en grande quantité



**Figure 47 :** Localisation du site de prélèvement (Thur, Haut Rhin) de l'eau utilisée au cours de l'exposition en laboratoire et pour la mesure du potentiel inhibiteur. Sont localisés à titre indicatif les sites situés en amont et en aval du point de prélèvement, sur lesquels ont été relevées les données physico-chimiques présentées en annexe 8.

## D – La Thur (Usine pétrochimique à Thann, Haut-Rhin, 68)

### 1 – Présentation du cours d'eau

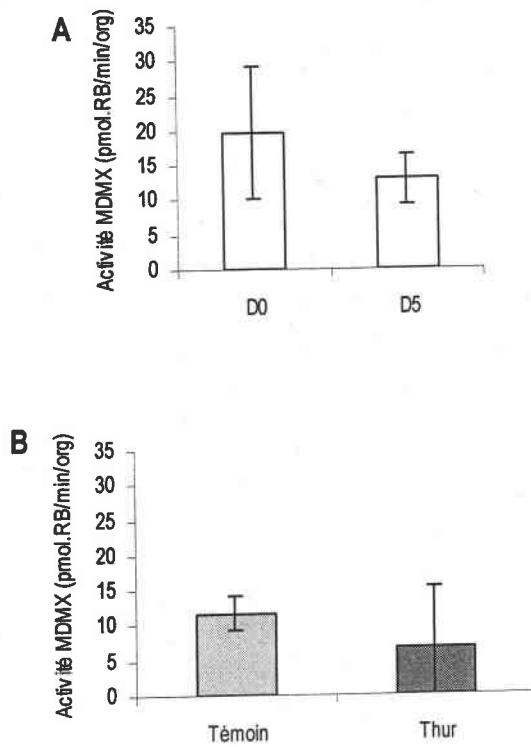
La Thur coule dans une vallée étroite, longue d'une vingtaine de kilomètres, et relativement urbanisée. La partie amont de la rivière dévale le versant alsacien des Vosges et fournit une eau fraîche et oxygénée offrant des conditions propices au maintien de populations piscicoles de salmonidés. Après son passage à Thann, la Thur voit sa qualité se dégrader légèrement du fait de la présence d'industries polluantes.

Les suivis effectués par la BERM au niveau de deux sites en amont et en aval de Thann (Figure 47) donnent une idée générale de la qualité de l'eau et renseignent sur les types de pollution présents sur ces sites. Le site en amont de Thann, localisé à Willer sur Thur, présente une eau de relativement bonne qualité (1B)\* selon les critères établis par la BERM pour les années 1995 à 2001 (Annexe 9). Aucun micropolluant ne fait l'objet d'un suivi sur ce site. Le site en aval de Thann, localisé à Staffelfelden, présentait une eau de qualité passable (2)\* de 1995 à 1998 (Annexe 9). La qualité s'est ensuite améliorée (1B)\*. Les micropolluants font l'objet d'un suivi régulier sur ce site (Annexe 9). Ainsi, en 2001, les métaux dont le cadmium, le nickel, le zinc et surtout le mercure présentent des taux non négligeables à la fois dans les bryophytes et les sédiments. Les relevés réalisés par la BERM font également état de la présence de micropolluants organiques tels que des pesticides et des hydrocarbures, parmi lesquels on retrouve à des taux élevés le benzo(a)pyrène et, dans une moindre mesure le fluoranthène et ses dérivés. Les composés organohalogénés adsorbables (AOX) ont également été suivis pendant quelques années, mais les mesures se sont arrêtées en 1999 malgré des taux importants de ces composés qu'on retrouve de 97 à 99 à des concentrations supérieures à 100µg/L de chlore (et jusqu'à plus de 300µg/L) sur au moins la moitié des relevés mensuels.

---

\* Les seuils et classes de qualité établis par le Réseau National de Bassin sont référencés en annexe 1





**Figure 48 :** Evolution de l'activité MDMX chez des dreissènes dépurées pendant 5 jours (D0 et D5) (A) et exposées pendant 3 jours à l'eau prélevée dans la Thur (B). Le milieu témoin est constitué d'eau déchlorée.

## 2 – Activité MDMX et potentiel inhibiteur de la Thur

### 2.1 – Prélèvement d'eau

Des échantillons d'eau ont été prélevés à Thann en aval du rejet d'une usine de pétrochimie (Figure 47). Un volume de 20L (bidon en polyéthylène) a été prélevé pour fournir le milieu d'exposition des dreissènes en laboratoire. De petits volumes ont été prélevés pour l'étude du potentiel inhibiteur selon le protocole décrit dans le chapitre 2.2 (§ II-B-2).

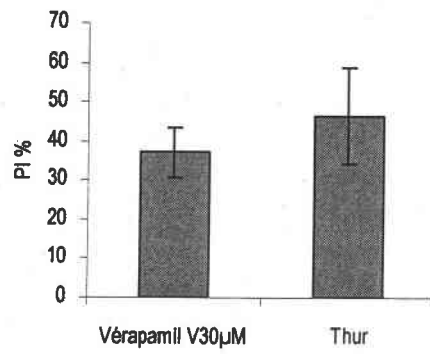
### 2.2 – Dépuration pré-exposition

Le niveau initial de l'activité MDMX présenté par les dreissènes a été contrôlé par la méthode d'efflux le lendemain du prélèvement (D0) et après 5 jours de dépuration en laboratoire (D5). Pendant la période de dépuration, les dreissènes ont été placées dans des bacs contenant 4,5 L d'eau déchlorée renouvelée tous les jours et additionnée de nourriture congelée pour invertébrés aquatiques. Les mêmes lots d'organismes (4 lots de 5 dreissènes) ont été utilisés pour les mesures à D0 et D5.

Le niveau d'activité initiale mesuré chez les dreissènes prélevées à La Maxe était de l'ordre de 20 pmol.RB/min./org. et une légère diminution a été enregistrée après 5 jours de dépuration. Cette diminution n'est pas significative, ce qui n'est pas surprenant étant donné le faible niveau initial mesuré après prélèvement (Figure 48).

### 2.3. Exposition

Quatre lots de dreissènes dépurées ont été exposées pendant trois jours à 4,5 L d'eau prélevée à Thann en aval du rejet de l'usine de produits chimiques. Quatre autres lots ont été placés en eau déchlorée (témoin). Les niveaux d'activité MDMX ont été contrôlés après 3 jours d'exposition (E3). Aucune mortalité n'a été enregistrée dans les milieux.



**Figure 49 :** Comparaison des potentiels inhibiteurs de l'eau prélevée dans la Thur et du vérapamil (30µM), évalués chez des dreissènes dépurées. Le potentiel inhibiteur, exprimé en pourcentage, a été calculé par rapport au milieu témoin (eau déchlorée).

Les dreissènes exposées pendant trois jours au milieu témoin présentent un niveau d'activité quasiment identique à l'activité dépurée. L'activité mesurée chez les dreissènes exposées à l'eau prélevée dans la Thur à Thann tend à diminuer mais n'est pas significativement différente de celle mesurée dans le milieu témoin. L'augmentation de l'écart-type traduit une augmentation de la variabilité de la réponse (figure 48).

## 2.4. Potentiel inhibiteur

Quatre lots de dreissènes dépurées ont été utilisées pour la mesure du potentiel inhibiteur de l'eau prélevée à Thann en aval du rejet de l'usine de produits chimiques. Le potentiel inhibiteur du vérapamil a également été évalué à titre de témoin selon le protocole décrit dans le chapitre 2.2 (§ II-B-3).

Parallèlement au suivi de l'activité MDMX, le potentiel inhibiteur de l'eau de la Thur a été testé et les résultats obtenus montrent que cette eau exerce un effet inhibiteur significatif (Figure 49) et équivalent à celui du vérapamil.

## 2.5. Bilan

Au cours de la dépuration pré-exposition, l'activité MDMX ne subit pas de diminution significative. En effet, le niveau initial mesuré après le prélèvement des dreissènes était déjà très faible et proche du niveau basal. Ce résultat a été confirmé par la mesure de l'activité MDMX chez les lots témoins exposés à l'eau déchlorée pendant trois jours. En effet, l'activité n'évolue plus et elle s'est stabilisée à son niveau basal. L'exposition à l'eau de la Thur n'a pas significativement modifié l'activité MDMX, mais a provoqué une augmentation de la variabilité qui met probablement en évidence l'apparition d'un stress ou d'une perturbation non traduits par la mesure de l'activité MDMX.

L'eau de la Thur présente un PI significatif, indiquant qu'elle contient des composés capables d'interagir directement avec le système MDMX. Ces composés substrats sont *a priori* susceptibles d'engendrer une induction de ce système. Toutefois, nous n'avons pas observé cette induction au bout de trois jours. L'augmentation de la durée d'exposition

aurait peut-être pu générer l'obtention d'une induction dans la mesure où l'évaluation du PI confirme la présence de substrats dans le milieu étudié.

L'ensemble de ces résultats souligne l'intérêt d'une double approche pour mieux cerner la réaction des organismes exposés : la mesure du potentiel inhibiteur évalue la présence de composés substrats et la mesure de l'activité MDMX évalue l'impact de ces substrats sur l'activation du système de défense MDMX.

#### Résumé

- L'exposition des dreissènes à l'eau de la Thur n'a pas engendré de modification de l'activité après 3 jours. Toutefois, une augmentation de la variabilité de la réponse a pu être observée, signalant peut-être l'existence d'une perturbation.
- La mesure du potentiel inhibiteur signale la présence de composés substrats.

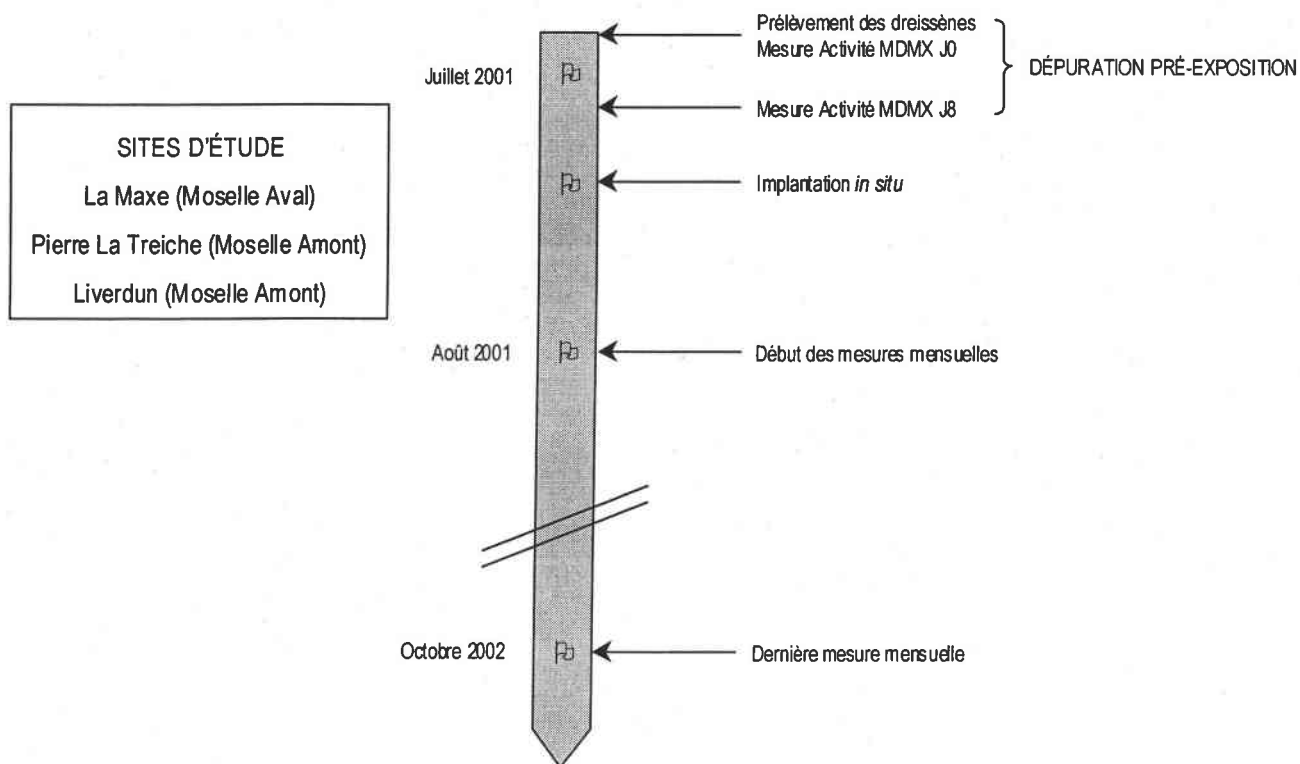
## Chapitre 3.4 : Suivi saisonnier de l'activité MDMX chez *Dreissena polymorpha* transférée en Moselle

Le présent chapitre aborde l'étude de la réponse de l'activité MDMX dans le cadre d'une expérimentation à long terme au cours de laquelle des dreissènes ont été transférées sur trois sites en Moselle pendant 15 mois. Des mesures mensuelles de l'activité MDMX présentée par les organismes encagés ont permis d'étudier l'évolution de la réponse en fonction du temps et en fonction du cycle saisonnier naturel du milieu au moyen de l'étude de ses caractéristiques physico-chimiques. En parallèle, le niveau de l'activité MDMX basale a été suivi sur cette même période.

### I – Présentation des sites d'étude

Les trois sites étudiés sont répartis le long de la Moselle. Deux sites ont été choisis dans sa partie amont, c'est à dire en amont de la confluence avec la Meurthe : Pierre La Treiche et Liverdun. Ces deux sites sont suivis depuis 1993 par la BERM qui leur attribue la note de qualité 1B\* (bonne qualité). Le site Liverdun a toutefois connu une période de dégradation de sa qualité durant les années 1998-1999 (2\*), mais la qualité s'est de nouveau améliorée depuis cette date (1B\*). Les notes de qualité attribuées à chacun des deux sites pour la période étudiée au cours de ce suivi sont présentées en annexe 10. Les mesures des paramètres physico-chimiques montrent en moyenne une qualité acceptable en regard des différentes altérations considérées. Seuls les paramètres concernant l'eutrophisation (matières azotées, nitrates, matières phosphorées) et les matières en suspension dénotent une légère altération de la qualité. Des données concernant la présence de micropolluants organiques et minéraux (Annexe 10) sont disponibles pour les mois d'août à décembre 2001 pour le site de Liverdun (les données 2002 ne sont pas encore disponibles) et font état de la présence de certains pesticides (DDT, DDE, endosulfan, deltaméthrine, simazine) et hydrocarbures aromatiques polycycliques (benzo(a)pyrène, benzo(b)fluoranthène, fluoranthène) à des concentrations relativement élevées d'après les

\* Les seuils et classes de qualité établis par le Réseau National de Bassin sont référencés en annexe 1



**Figure 50 :** Déroulement des différentes étapes du suivi de l'activité MDMX chez des dreissènes encagées sur trois sites étudiés en Moselle : La Maxe, Pierre La Treiche et Liverdun. Après une période de dépuración, les dreissènes ont été implantées au mois de juillet 2001. Les premières mesures de l'activité ont débuté en août 2001 et ont été poursuivies jusqu'en octobre 2002.

seuils de qualité reportés en annexe 1. Les concentrations en métaux restent relativement faibles et font état d'une bonne qualité en ce qui concerne ce paramètre.

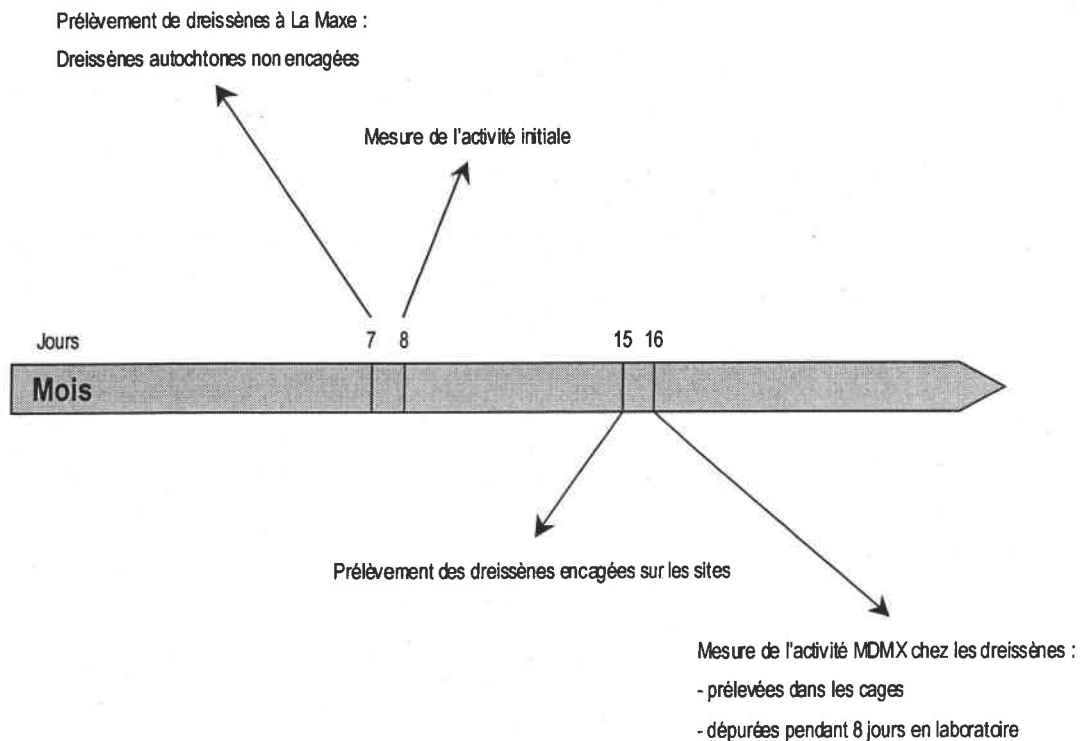
Le troisième site d'étude est localisé à La Maxe dans la partie aval de la Moselle et correspond au site d'origine de toutes les dreissènes utilisées au cours de ce travail de thèse. La qualité générale de ce site est définie par celle attribuée par la BERM aux points de relevés situés en amont et en aval, respectivement Ars Sur Moselle et Hauconcourt (les caractéristiques physico-chimiques de ces sites sont détaillées dans le chapitre 2.1. (§ II) et en annexe 2. La qualité générale de la Moselle à Ars Sur Moselle a oscillé entre bonne (1B) et passable (2) entre 1995 et 2001. A Hauconcourt elle est considérée comme passable (2) sur cette même période. Le site de La Maxe est considéré ici comme un site de référence, non pas en terme de qualité physico-chimique, mais en terme de préférendum écologique des dreissènes. En effet, ces organismes se développent naturellement sur ce site et présentent des densités importantes, alors qu'en Moselle amont, leurs populations sont plus fragiles et leurs densités plus faibles.

## II – Déroulement du suivi

### A – Dépuration pré-exposition

Les dreissènes (2550) ont été prélevées à la Maxe au début du mois de juillet 2001 et ramenées en laboratoire dans l'eau de leur site d'origine. Le niveau initial de l'activité MDMX a été mesuré le lendemain (J0). Pour cela neuf lots de cinq dreissènes ont été choisis aléatoirement parmi les organismes prélevés. Les dreissènes ont ensuite été dépurées en eau déchlorée et le niveau d'activité MDMX a été contrôlé après huit jours (J8) en utilisant les mêmes organismes que ceux utilisés lors de la mesure à J0. L'ensemble de ces dreissènes a ensuite été transféré sur les 3 sites étudiés sur la Moselle. L'ensemble du déroulement de ce suivi est résumé sur la figure 50.





**Figure 51 : Déroulement chronologique des mesures de l'activité MDMX**

- chez des dreissènes autochtones de La Maxe : les organismes (15) sont prélevés (jour 7) à La Maxe et le niveau initial de l'activité est mesuré le lendemain (jour 8). Ils sont ensuite placés en eau déchlorée pendant 8 jours. Le niveau d'activité est alors contrôlé (jour 16)
- chez les dreissènes encagées sur les trois sites étudiés : les organismes (15 par site) sont prélevés dans les cages (jour 15) et ramenés en laboratoire pour la mesure de l'activité MDMX, qui est effectuée le lendemain (jour 16)

## B – Exposition *in situ* et suivi de l'activité MDMX

Le suivi de l'activité MDMX chez les dreissènes transférées a consisté à prélever chaque mois à une date fixe 15 dreissènes (3 lots de 5) de même taille dans les cages transférées sur les différents sites d'étude, et ce pendant 15 mois consécutifs. Les dreissènes ont été ramenées au laboratoire dans des bidons de 2L en polyéthylène contenant l'eau du site. En parallèle, la température de l'eau a systématiquement été relevée.

Le lendemain du prélèvement, les niveaux d'activité MDMX présentés par les organismes ont été évalués par la méthode d'efflux.

## C – Suivi de l'activité basale

En parallèle au suivi de l'activité MDMX chez les dreissènes transférées, les niveaux d'activité basale ont également été contrôlés chez des dreissènes non encagées prélevées à La Maxe.

Pour ce faire, les dreissènes sont prélevées à La Maxe huit jours avant la campagne de terrain visant à prélever les organismes encagés. Le niveau initial de l'activité est contrôlé, puis les organismes sont dépurés en eau déchlorée. Le niveau d'activité est ensuite contrôlé au bout de 8 jours de dépuration (Activité Basale), au même moment que la mesure de l'activité présentée par les dreissènes encagées *in situ* (Figure 51).

## D – Traitement statistique

La conformité à une loi normale des distributions statistiques analysées a été vérifiée avec un test de normalité de Kolmogorov-Smirnov (KS,  $\alpha=0,05$ ). Bien que les variances ne soient pas strictement homogènes (test de Levene,  $p<0,05$ ), nous avons appliqué le test *t* de Student ( $\alpha=0,05$ ), suffisamment robuste, pour comparer deux moyennes. L'ANOVA non paramétrique de Kruskal Wallis (KW,  $\alpha=0,05$ ) a été utilisée pour la comparaison de plusieurs moyennes.

Les intervalles de confiance à 90% de la moyenne des résultats acquis pour chaque site d'étude et pour l'activité basale sont définis comme

$$P[\bar{x} - 1,645s_x < \bar{x} < \bar{x} + 1,645s_x] = 0,9$$

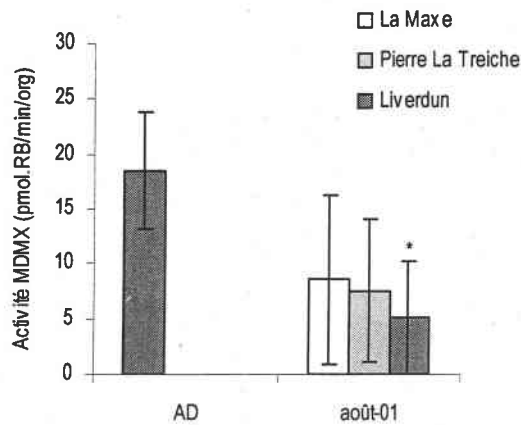
$\bar{x}$  étant la moyenne de l'échantillon et  $s_x$  l'écart-type. Le calcul de ces intervalles de confiance a donné des limites inférieures négatives. Ces valeurs négatives ne correspondant à aucune réalité biologique, elles ont été rapportées à zéro.

Afin de comprendre dans quelle mesure la physico-chimie globale de la rivière peut refléter la réponse de l'activité MDMX, une Analyse en Composantes Principales normées (ACP) a été réalisée à partir d'une matrice de données comportant 15 descripteurs physico-chimiques en colonne et 59 observations (sites/date) en ligne. L'objectif étant de déterminer s'il existe une relation entre la réponse mesurée et les caractéristiques physico-chimiques étudiées, la variable « activité MDMX », à expliquer, a été projetée *a posteriori* comme variable supplémentaire sur le cercle des corrélations, c'est à dire qu'elle ne participe pas à la construction des axes. Ce mode de traitement permet de mettre en évidence de manière objective les liaisons entre la variable à expliquer (activité MDMX) et les variables explicatives (descripteurs physico-chimiques) (Philippeau, 1986). Afin de privilégier la variabilité inter-dates et de minimiser l'effet des différences inter-sites, les résultats présentés sont ceux d'une ACP intra-station (Dolédéc et Chessel, 1987).

Des corrélations de Pearson ont été calculées pour vérifier le degré de liaison (i) entre les activités mesurées sur les différents sites et (ii) entre la température de l'eau et l'activité MDMX exprimée en logarithme décimal.

Enfin, une régression linéaire multiple a permis de dégager les contributions relatives des différents paramètres physico-chimiques dans les variations de la réponse de l'activité MDMX.

L'ensemble des analyses statistiques a été effectué à l'aide du logiciel Statistica (Statsoft, version 1999), excepté pour l'ACP intra-site qui a été réalisée à l'aide du logiciel ADE-4 (Thioulouse *et al.*, 1997).



**Figure 52 :** Comparaison du niveau d'activité dépurée (AD) obtenue après maintien des dreissènes huit jours en eau déchlorée et des niveaux mesurés après un mois de transfert (août 2001) in situ sur les sites de La Maxe, Pierre La Treiche et Liverdun. Le symbole \* indique une différence significative entre l'activité mesurée en août 2001 et l'activité dépurée ( $p < 0,05$ ).

**Tableau XII :** Matrice de corrélation construite à partir des moyennes mensuelles de l'activité basale et de l'activité mesurée chez les dreissènes transférées à La Maxe, Pierre la Treiche et Liverdun. Tous les coefficients de corrélation calculés indiquent une relation significative entre les activités ( $r_{\text{Pearson}}$   $p < 0,05$ ).

	Activité Basale	La Maxe	Pierre La Treiche	Liverdun
Activité Basale	1			
La Maxe	0,75	1		
Pierre La Treiche	0,73	0,90	1	
Liverdun	0,62	0,89	0,98	1

**Note :**

En décembre 2001, toutes les activités mesurées étaient nulles et n'apparaissent donc pas sur les graphiques.

Par ailleurs, les résultats présentent quelques valeurs manquantes. En avril 2002, il n'a pas été possible de mesurer l'activité basale pour des raisons techniques. En octobre 2002, la mesure n'a pas été effectuée à Liverdun car le stock de dreissènes encagées était épuisé. Pour Pierre La Treiche, seulement deux mesures ont été effectuées pour les mêmes raisons, d'où l'absence d'écart-type.

### III – Résultats obtenus lors du suivi de l'activité MDMX chez des dreissènes transférées pendant 15 mois sur trois sites en Moselle

#### A – Dépuration pré-exposition

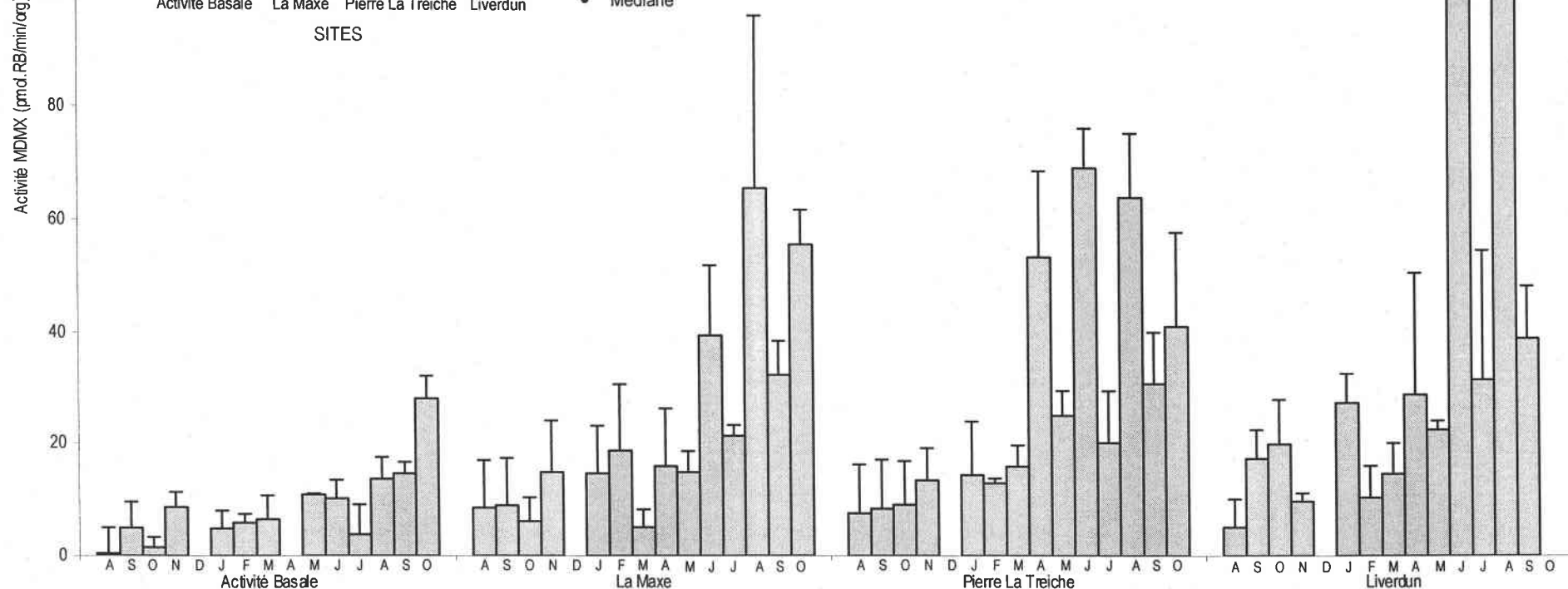
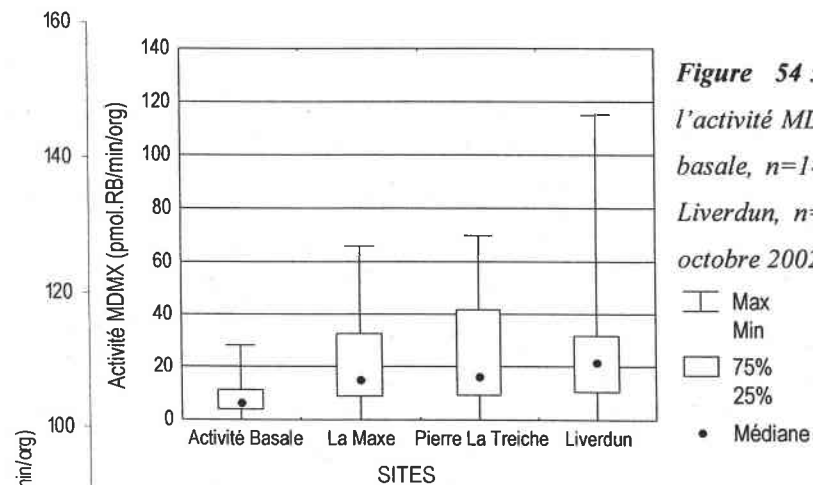
Le niveau initial de l'activité MDMX chez les dreissènes utilisées pour le transfert *in situ* au mois de juillet 2001 était de 52 pmol.RB/min/org. Après huit jours de dépuration en laboratoire, l'activité MDMX a été réduite d'un facteur 3 et atteignait un niveau de l'ordre de 18 pmol.RB/min/org.

#### B – Suivi de l'activité MDMX

##### 1 – Observations globales

L'activité MDMX mesurée après un mois d'exposition à La Maxe et Pierre La Treiche (août 2001) tend à être réduite par rapport à l'activité dépurée mesurée avant transfert (Figure 52). Etonnamment, cette réduction est significative dans le cas des dreissènes transférées à Liverdun.

La figure 53 présente les profils de réponse de l'activité basale et des activités MDMX mesurées chez les dreissènes transférées *in situ* pendant 15 mois. Des régressions linéaires



**Figure 53 :** Suivi de l'activité MDMX chez des dreissènes dépurées en laboratoire (Activité basale) et chez des dreissènes implantées sur trois sites naturels en Moselle (La Maxe, Pierre La Treiche et Liverdun) pendant 15 mois (août 2001 à octobre 2002). Les résultats présentés sont les moyennes et écart-types de trois valeurs (les barres inférieures des écart-types ne sont pas présentées sur la figure pour une meilleure lisibilité).

ont été établies entre ces profils et les corrélations obtenues sont significatives (Tableau XII). Ce résultat indique que les profils de réponse obtenus sur les différents sites naturels, ainsi que le profil de réponse de l'activité basale sont similaires, c'est à dire que lorsque l'activité augmente sur un site, elle augmente également sur les autres sites. Cette concordance de la réponse MDMX est la plus marquée pour les deux sites étudiés en Moselle amont, Pierre La Treiche et Liverdun ( $r_{\text{Pearson}} = 0,98$ ).

Au cours des 15 mois du suivi, une tendance à l'augmentation de l'activité a été observée, et ce, principalement pendant la période estivale. La même tendance est observée en ce qui concerne l'activité basale (Figure 53).

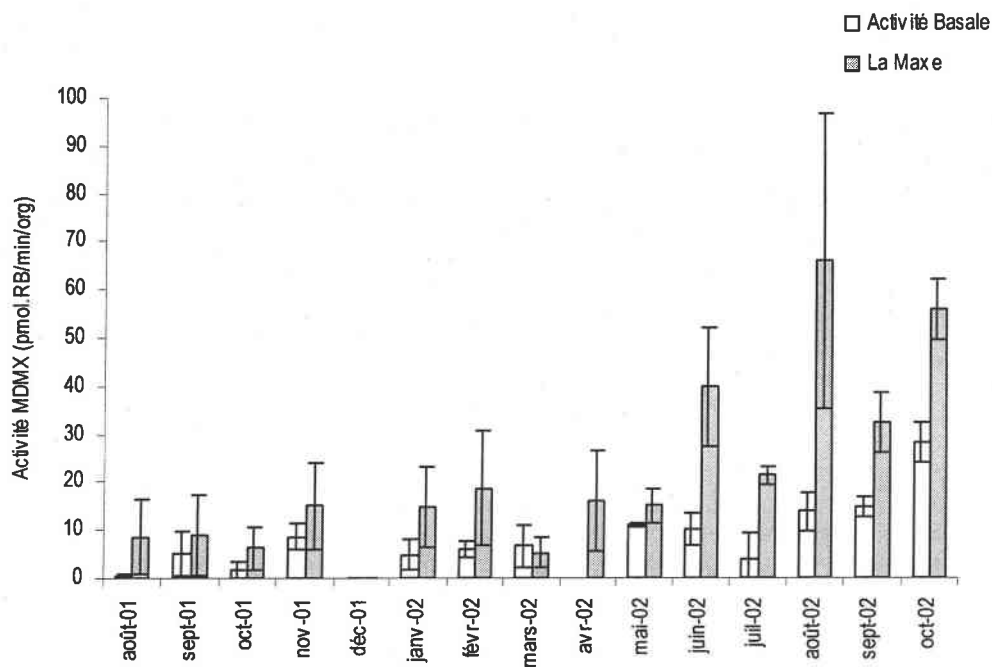
Il est à noter que, dans les quatre situations étudiées, les niveaux d'activité MDMX mesurés de août à octobre 2001 sont particulièrement faibles par rapport à ceux mesurés sur la même période en 2002.

D'un point de vue global, les moyennes mensuelles les plus faibles sont obtenues pour l'activité basale, alors que les plus fortes ont été mesurées chez les dreissènes transférées à Liverdun. Celles mesurées chez les organismes transférées à La Maxe et à Pierre La Treiche sont du même ordre de grandeur et présentent des valeurs intermédiaires (Figures 53 & 54). Les mêmes observations peuvent être faites en ce qui concerne l'amplitude des réponses mensuelles mesurées dans les quatre situations étudiées (Figure 54).

## 2 – Activité Basale et La Maxe

### 2.1 – Activité basale (Figure 55)

Les valeurs de l'activité basale suivent une distribution normale (KS,  $p > 0,05$ ). Les résultats de l'ANOVA non paramétrique réalisée à partir des mesures effectuées sur l'ensemble du suivi montrent l'existence d'un effet temporel significatif (KW,  $p = 0,002$ ). L'activité basale, faible au début du suivi, tend à augmenter au fil du temps et l'augmentation est particulièrement marquée au mois d'octobre 2002. Deux groupes de mois homogènes peuvent être définis : le premier comprend les mois de septembre 2001, novembre 2001 à mars 2002 et juillet 2002 (KW,  $p = 0,216$ ). Le second groupe comprend les mois de mai, juin, août et septembre 2002 (KW,  $p = 0,083$ ). La forte activité mesurée au mois d'octobre 2002 n'intègre aucun de ces deux groupes sur le plan statistique, mais est à rapprocher des réponses obtenues en été.



**Figure 55 :** Evolution de l'activité MDMX de août 2001 à octobre 2002 chez des dreissènes prélevées à La Maxe puis dépurées huit jours en laboratoire (Activité Basale) et chez des dreissènes encagées à La Maxe. En décembre 2001, l'activité mesurée dans les deux situations testées était nulle. En avril 2002, il n'a pas été possible d'évaluer l'activité basale.



La moyenne et l'écart-type des valeurs obtenues pour l'activité basale sur l'ensemble des dates ont été estimés respectivement à 8,15 et 7,63 pmol.RB/min/org. L'intervalle de confiance à 90% calculé sur ces valeurs a permis d'estimer la limite inférieure du niveau de l'activité MDMX basale à 0 et la limite supérieure à 20,7 pmol.RB/min/org.

## 2.2 – La Maxe (Figure 55)

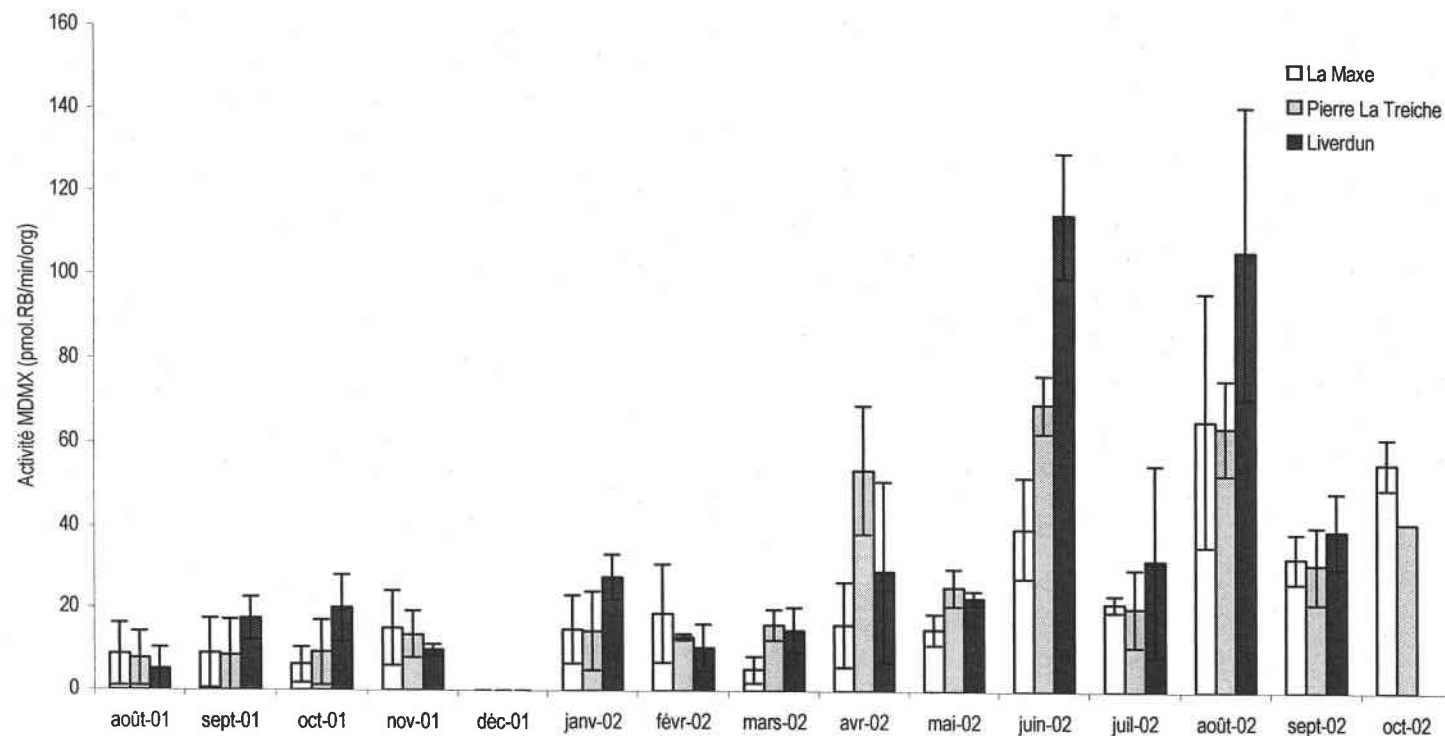
Les valeurs de l'activité MDMX mesurée chez les dreissènes transférées à La Maxe suivent une distribution normale (KS,  $p > 0,05$ ). Les résultats de l'ANOVA non paramétrique réalisée à partir des mesures effectuées sur l'ensemble du suivi montrent l'existence d'un effet temporel significatif (KW,  $p = 0,0007$ ).

Les activités mesurées de août 2001 à mai 2002 constituent un groupe statistiquement homogène, car aucune différence significative n'a pu être observée entre les différents mois qui le composent (KW,  $p = 0,254$ ). Pendant cette période, les niveaux d'activité moyens sont restés inférieurs au seuil maximum défini précédemment pour l'activité basale, à savoir 20,7 pmol.RB/min/org. A partir de juin, les réponses obtenues sont différentes de celles des mois précédents. Les niveaux moyens atteints sont supérieurs au seuil pré-cité et plus hétérogènes (KW,  $p = 0,015$ ).

La moyenne et l'écart-type des valeurs obtenues pour La Maxe ont été estimés respectivement à 21,6 et 20,6 pmol.RB/min/org. L'intervalle de confiance à 90% calculé sur ces valeurs a permis d'estimer la limite inférieure du niveau de l'activité MDMX à 0 et la limite supérieure à 55,5 pmol.RB/min/org.

## 2.3 – Comparaison Activité Basale / La Maxe

La comparaison des deux profils (Figure 55) montre que l'activité mesurée à La Maxe n'est pas différente de l'activité basale sur toute la période de août 2001 à mai 2002 (comparaison des activités à chaque date, test  $t$ ,  $p > 0,05$ ). Les différences entre ces deux activités deviennent significatives à partir du mois de juin (comparaison des activités à chaque date, test  $t$ ,  $p_{max} = 0,043$ ). Sur cette base, on peut considérer qu'il y a induction de l'activité MDMX dans la seconde partie du suivi.



**Figure 56 :** Evolution de l'activité MDMX de août 2001 à octobre 2002 chez des dreissènes encagées à La Maxe, Pierre La Treiche et Liverdun. En décembre 2001, l'activité mesurée chez les dreissènes implantées sur les trois sites était nulle.

### 3 – Réponse obtenue sur les sites étudiés sur la Moselle Amont comparée à la réponse obtenue à La Maxe

#### 3.1 – Pierre La Treiche (Figure 56)

Les valeurs de l'activité MDMX mesurée chez les dreissènes transférées à Pierre La Treiche suivent une distribution normale (KS,  $p > 0,05$ ). Les résultats de l'ANOVA non paramétrique réalisée à partir des mesures effectuées sur l'ensemble du suivi montrent l'existence d'un effet temporel significatif (KW,  $p = 0,0013$ ).

Les résultats obtenus à Pierre La Treiche présentent des valeurs homogènes (KW,  $p = 0,13$ ) et de l'ordre de celles mesurées pour l'activité basale ( $< 20,7$  pmol.RB/min/org) de août 2001 à mars 2002. La seconde partie du profil est plus hétérogène (avril à octobre 2002 ; KW,  $p = 0,018$ ) et présente des valeurs globalement plus élevées.

De mars à juin 2002, l'activité MDMX mesurée à Pierre La Treiche est significativement induite par rapport à celle mesurée à La Maxe (comparaison des activités à chaque date, test  $t$ ,  $p_{\max} = 0,04$ ).

La moyenne et l'écart-type des valeurs obtenues pour Pierre La Treiche ont été estimés respectivement à 25,5 et 22,5 pmol.RB/min/org. L'intervalle de confiance à 90% calculé sur ces valeurs a permis d'estimer la limite inférieure du niveau de l'activité MDMX basale à 0 et la limite supérieure à 62,6 pmol.RB/min/org.

#### 3.2 – Liverdun (Figure 56)

Les valeurs de l'activité MDMX mesurée chez les dreissènes transférées à Liverdun suivent une distribution normale (KS,  $p > 0,05$ ). Les résultats de l'ANOVA non paramétrique réalisée à partir des mesures effectuées sur l'ensemble du suivi montrent l'existence d'un effet temporel significatif (KW,  $p = 0,0034$ ).

Les réponses mesurées à Liverdun suivent globalement le même profil que celles obtenues pour La Maxe et Pierre La Treiche. Toutefois, des différences se dégagent. Alors que l'activité MDMX évaluée à La Maxe et Pierre La Treiche présentait des réponses relativement stables pendant la période s'étendant de août 2001 à mars 2002, les réponses obtenues à Liverdun sont beaucoup plus hétérogènes dans le sens où les différences

SITES	DATES	O2% %	DBO5 mgO2/L	DCO mgO2/L	COD mgC/L	Ntot mg/L	NH4 mgNH4/L	NO2 mgNO2/L	NO3 mgNO3/L	P mg/L	PO4 mgPO4/L	MES mg/L	T °C	COND µS/cm	pH	Chloro a µg/L
ARS	août-01	70	2	15	3,6	1	0,13	0,11	5,2	0,18	0,4	7,4	23	1100	7,5	0,5
	sept-01	75	2	19	3,5	2	0,22	0,34	5,1	0,25	0,24	8	16	1490	7,5	1,6
	oct-01	87	2	12,5	3	2,5	0,13	0,02	9,15	0,13	0,14	4,2	15,5	1560	7,6	0,6
	nov-01	94	2	16	3,2	3	0,14	0,4	9,7	0,16	0,12	11,7	6,5	1700	7,8	0,1
	déc-01	92	3	16	2,5	3	0,62	0,6	9,8	0,15	0,09	11,2	3	1490	7,9	2,2
	janv-02	93	3	14	2,5	3	0,29	0,09	9,5	0,13	0,21	17,8	3,5	1580	8,1	0,1
	févr-02	100	3	18	2,4	2	0,21	0,08	9,5	0,13	0,03	52,8	8	1790	7,9	0,1
	mars-02	97	3	29	3,5	4	0,18	0,19	15,8	0,28	0,09	187,2	11	661	7,9	10,8
	avr-02	131	3	37	1,6	2	0,04	0,13	5,9	0,07	0,03	22,7	12	1480	8,6	73,4
	mai-02	112	3	27	3,7	2	0,04	0,12	3,6	0,11	0,03	12,6	18	1970	8	43,2
	juin-02	91	3	16	3,6	2	0,14	0,36	5,3	0,17	0,09	11,9	26	1670	7,6	21,6
	juil-02	111	3	24	3,5	2	0,06	0,14	4	0,2	0,09	17,8	23	1444	7,8	34
	août-02	68	3	28	3,5	1	0,21	0,22	4,5	0,21	0,31	4,8	25	1380	7,4	20
	sept-02	92	3	26	4	2	0,08	0,12	5,3	0,24	0,41	7,4	20	1590	7,7	4,9
	oct-02	92	3	20	4,5	2	0,19	0,125	5,95	0,145	0,15	8	15	1405	7,7	0,6
HAUC	août-01	74	2	16	3,6	1,5	0,2	0,08	5,60	0,19	0,43	14,7	23	1130	7,4	4,85
	sept-01	76	2	19	3,4	2	0,5	0,23	6,35	0,22	0,21	16	16	1490	7,7	2,95
	oct-01	88	2	20	2	2,67	0,02	0,12	9,57	0,15	0,06	10	15,5	1360	7,7	2,67
	nov-01	95	3	20	3,1	3	0,3	0,27	9,30	0,15	0,06	19	6,5	1350	7,8	1,65
	déc-01	93	2	12	2,9	6	0,49	0,25	11,90	0,14	0,09	7,2	3	1450	7,8	1,1
	janv-02	93	3	18	2,8	3	0,41	0,11	9,9	0,06	0,09	22	3,5	1550	7,9	2,2
	févr-02	94,5	3,5	18	2,55	2,5	0,235	0,105	8,5	0,125	0,03	53,55	8	1205	7,9	3,25
	mars-02	97,5	3	20	3,4	3,5	0,22	0,145	12	0,185	0,075	78,15	11	842,5	7,9	4,1
	avr-02	115,3	3,3	17,7	2,30	2,3	0,32	0,15	7,1	0,10	0,03	14,37	12	1213	8,07	43,9
	mai-02	122	3	22,5	3,6	2,5	0,07	0,22	8,5	0,12	0,06	17,4	18	1510	8,1	52,35
	juin-02	102	4	27	4,25	1,5	0,095	0,395	3,95	0,17	0,09	16,25	26	1635	7,8	28,65
	juil-02	102,5	3	21	3,6	1	0,06	0,11	1,15	0,205	0,07	19,3	23	1485	7,65	30,25
	août-02	68	3	18,5	2,8	1,5	0,255	0,095	5,5	0,205	0,325	9,8	25	1225	7,4	3,25
	sept-02	91	3	28,5	2,5	2,5	0,125	0,15	6,1	0,255	0,175	14,85	20	1450	7,8	24,85
	oct-02	88,33	3	22	4,6	2,10	0,20	0,12	6,37	0,17	0,16	11,67	15	1467	7,63	2,7
PLT	août-01	68	2	15	3,4	1	0,13	0,07	3,3	0,14	0,28	13,6	23	390	7,3	8,1
	sept-01	79	2	28	3	1	0,19	0,03	2,5	0,19	0,18	13,6	14	500	7,5	6,5
	oct-01	83	2	12	2,6	2	0,08	0,03	6	0,1	0,09	3,4	14,5	292	7,5	1,6
	nov-01	99	2	9	2,7	2	0,09	0,03	4,7	0,12	0,15	8,4	4,5	371	7,8	0,7
	déc-01	94	2	18	2,4	2	0,07	0,05	8,4	0,1	0,03	10,2	1	262	7,6	1,1
	janv-02	93	3	11	1,5	3	0,18	0,04	8,9	0,09	0,15	12	2	543	8	1,1
	févr-02	101	3	10	2,2	2	0,05	0,03	7,3	0,1	0,06	7,8	6	309	7,9	1,1
	mars-02	94	3	6	1,3	2	0,02	0,03	8	0,09	0,06	4,4	10	345	8,1	3,8
	avr-02	108	3	9	1,4	2	0,04	0,03	4,9	0,05	0,03	7,8	10	399	8,6	22,7
	mai-02	93	3	12	3,2	2	0,05	0,05	4,9	0,09	0,06	4,7	16	285	7,9	10,8
	juin-02	86	3	13	3,1	2	0,13	0,07	4,9	0,22	0,12	11,6	25	405	7,7	14
	juil-02	131	3	15	3,1	1	0,04	0,03	1,7	0,13	0,06	9,2	22	515	8,1	27
	août-02	81	3	12	3,3	1	0,13	0,04	1,5	0,18	0,15	9,7	24,5	475	7,9	28,1
	sept-02	96,5	3	20	3,4	1	0,07	0,035	3,05	0,015	0,0125	5,25	18,5	450	8	24,3
	oct-02	106	3	7	4,3	1,71	0,07	0,03	5	0,13	0,09	15,6	13	197	7,1	1,1
LIV	août-01	79	2	16	3,15	1	0,145	0,07	4,25	0,145	0,23	6,6	22	405	7,55	2,15
	sept-01	87	2	12	2,9	1	0,115	0,035	3,9	0,16	0,105	10,5	14	354	7,5	1,9
	oct-01	86	2	9	2,3	2,5	0,07	0,083	7,2	0,11	0,13	3,7	14	389	7,5	0,6
	nov-01	91	2	12,5	2,65	2	0,05	0,045	7,95	0,085	0,105	9	5,5	475	7,75	1,1
	déc-01	90	2	38	2,3	2	0,21	0,07	8,7	0,1	0,09	2,4	2	420	7,8	2,2
	janv-02	93	3	15	2,8	3	0,15	0,07	10,8	0,12	0,09	10,6	3	576	8	1,4
	févr-02	94	3	10,5	1,85	2	0,075	0,04	7,7	0,08	0,045	8,1	6,5	408,5	7,8	0,8
	mars-02	100	3	20,5	3,1	3	0,235	0,09	12,15	0,215	0,12	104,7	9	325	7,85	7,3
	avr-02	118	3	13,3	2,2	3	0,04	0,04	8,2	0,08	0,03	12,8	11	389	8,3	29,2
	mai-02	110	3	13	3	2	0,065	0,08	5,8	0,125	0,09	8,95	16	455,5	7,9	18,4
	juin-02	103	3	14	3,7	1,5	0,125	0,04	2,8	0,135	0,09	8,6	25	435,5	7,9	11,4
	juil-02	95,5	3	14,5	3,1	1	0,065	0,025	1,65	0,14	0,08	10,35	21,5	427	7,95	26,5
	août-02	83,5	3	15	3,25	1	0,095	0,045	2,8	0,13	0,215	6,5	25	436	7,8	11
	sept-02	88,5	3	13	3,85	2	0,055	0,035	3,8	0,175	0,2	5,4	19	478,5	7,75	4,4

*Tableau XIII : Principales caractéristiques physico-chimiques de la Moselle au niveau des sites étudiés en Moselle. Les données utilisées pour Pierre La Treiche (PLT) et Liverdun (LIV) sont extraites de la BERM. Aucune donnée n'étant disponible pour le site La Maxe, les paramètres physico-chimiques relevés par la BERM sur les sites amont (Ars sur Moselle, ARS) et aval (Hauconcourt, HAUC) sont utilisés. Les valeurs du paramètre température sont celles que nous avons relevées au cours de chaque campagne de prélèvement des dreissènes.*

significatives entre les mois sont plus fréquentes (KW,  $p=0,0098$ ). Pendant cette période, les activités atteignent des niveaux proches de 20,7 pmol.RB/min/org. A partir du mois d'avril 2002, l'activité est plus élevée et atteint des valeurs de l'ordre de 120 pmol.RB/min/org en juin et août 2002. Comme dans le cas des autres sites, cette période présente des réponses hétérogènes (KW,  $p=0,0307$ ).

En mai 2002, l'activité MDMX évaluée chez les organismes transférés à Liverdun est significativement induite par rapport à celle mesurée à La Maxe (test  $t$ ,  $p=0,031$ ).

Seuls les niveaux relevés en juin 2002 sont significativement différents de ceux obtenus à la fois à La Maxe (test  $t$ ,  $p=0,0026$ ) et à Pierre La Treiche (test  $t$ ,  $p=0,0092$ ).

La moyenne et l'écart-type des valeurs obtenues pour Liverdun ont été estimés respectivement à 32,1 et 36,2 pmol.RB/min/org. L'intervalle de confiance à 90% calculé sur ces valeurs a permis d'estimer la limite inférieure du niveau de l'activité MDMX basale à 0 et la limite supérieure a été établie à 91,7 pmol.RB/min/org.

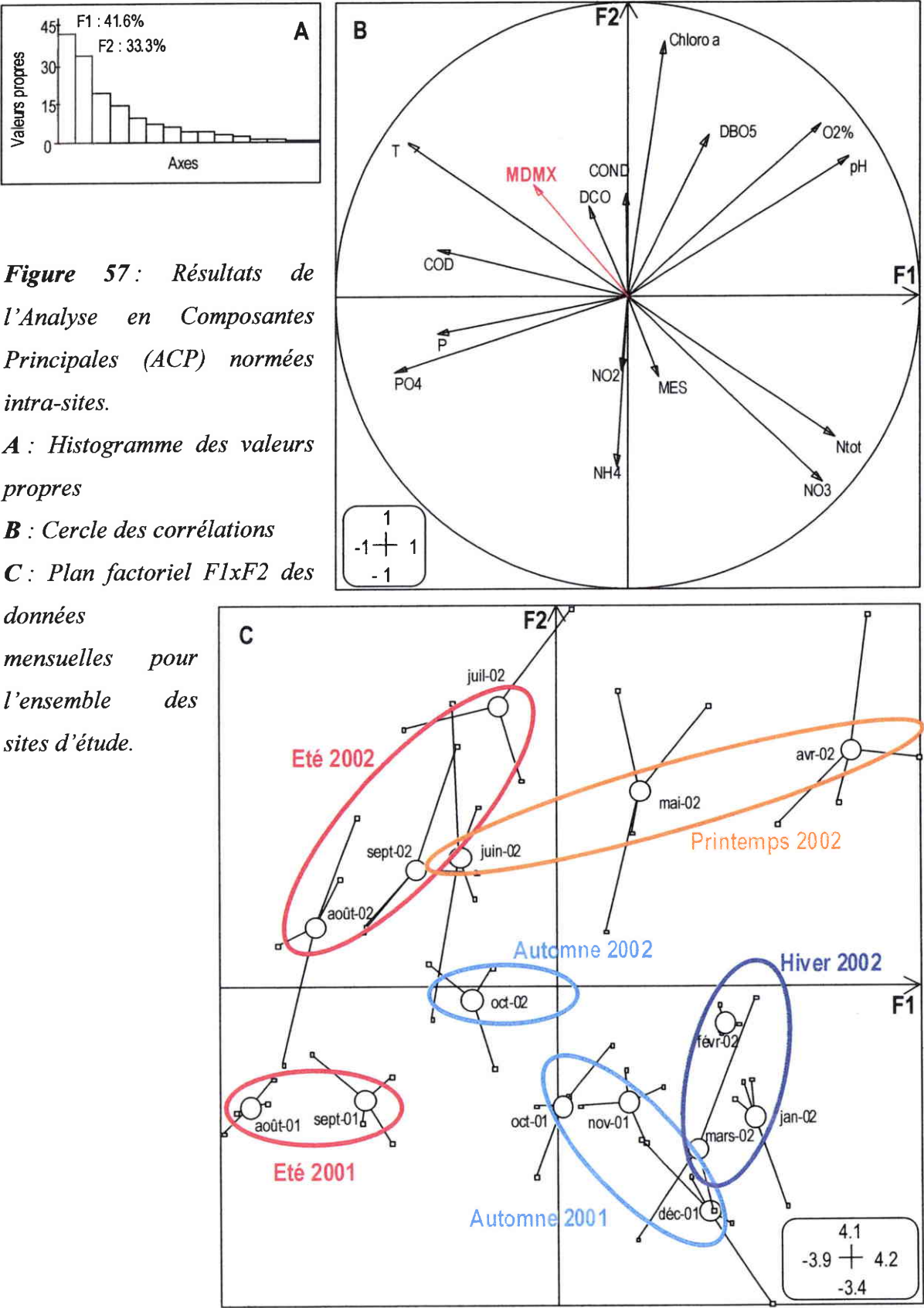
## C – Structure temporelle et relation entre activité MDMX et physico-chimie

Les principales caractéristiques physico-chimiques de la Moselle au niveau des sites étudiés sont présentées dans le tableau XIII. Les données utilisées pour Pierre La Treiche et Liverdun sont extraites de la BERM. Aucune donnée n'étant disponible pour le site La Maxe, les paramètres physico-chimiques relevés par la BERM sur les sites amont (Ars sur Moselle) et aval (Hauconcourt) ont été utilisés pour l'analyse des données acquises à La Maxe.

### 1 – Analyse globale : Analyse en Composantes Principales (ACP) (Figure 57)

Afin de comprendre dans quelle mesure l'évolution temporelle de la physico-chimie globale de la Moselle peut refléter la réponse de l'activité MDMX sur les sites naturels étudiés, une analyse en composantes principales normées intra-sites a été réalisée.

Le cercle des corrélations permet de dégager les paramètres structurant le mieux le profil physico-chimique de l'ensemble des sites.



**Figure 57 :** Résultats de l'Analyse en Composantes Principales (ACP) normées intra-sites.

**A :** Histogramme des valeurs propres

**B :** Cercle des corrélations

**C :** Plan factoriel F1xF2 des données mensuelles pour l'ensemble des sites d'étude.

L'axe F1 (41,6% de variance expliquée) est défini principalement par la température, le carbone organique dissous, les matières phosphorées et, en opposition, par les matières azotées (nitrates et azote total).

L'axe F2 (33,3% de variance expliquée) est défini par les teneurs en chlorophylle a et la demande biologique en oxygène (DBO<sub>5</sub>) en opposition aux concentrations en ammonium.

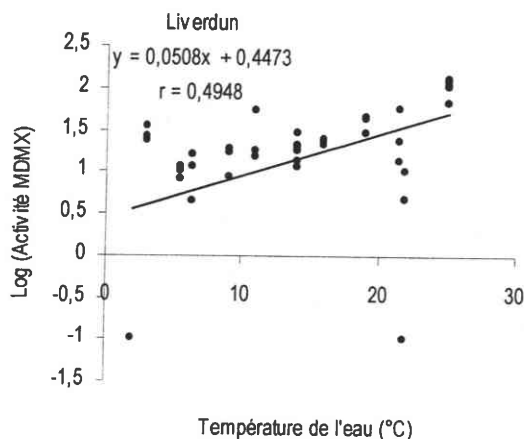
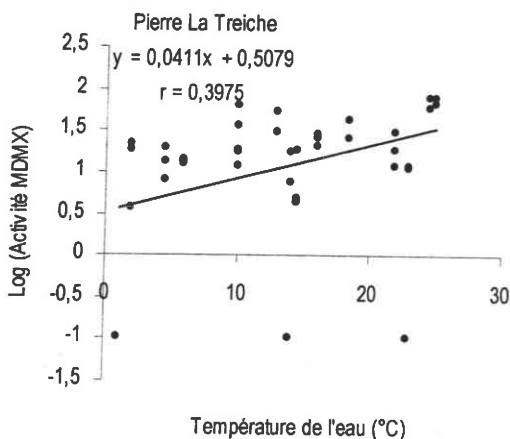
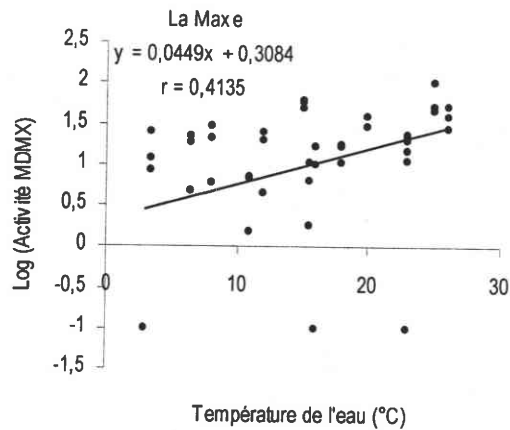
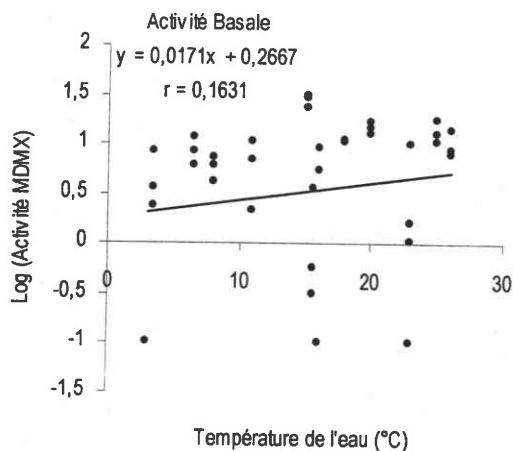
Les paramètres tels que la conductivité, la demande chimique en oxygène (DCO), la teneur en nitrites et les matières en suspension ne sont pas suffisamment représentés sur le cercle des corrélations pour être considérés comme des variables explicatives et ne participent donc pas à la structuration des données dans le plan factoriel F1xF2.

L'activité MDMX, projetée comme variable illustrative sur ce cercle des corrélations, apparaît liée positivement à la température de l'eau et négativement à la teneur en nitrates.

Les centres de gravité des données mensuelles de physico-chimie acquises sur les sites étudiés en Moselle sont positionnés sur le plan factoriel F1xF2. Ce plan permet la mise en évidence d'un cycle saisonnier. Pour plus de clarté, les différentes saisons incluses dans le suivi ont été individualisées par des ellipses. En superposant le cercle des corrélations et le plan factoriel, le cycle saisonnier apparaît structuré essentiellement par l'axe F1 qui distingue clairement les mois d'été, caractérisés par des fortes températures, et les mois d'hiver, caractérisés par des teneurs en nitrates élevées à cette saison. Les saisons printemps et automne sont également structurées par l'axe F1 pour les mêmes raisons, mais l'axe F2 permet de les distinguer principalement selon la DBO<sub>5</sub> et les teneurs en chlorophylle a (développement végétal), plus importantes au printemps et les teneurs en ammonium qui apparaissent plus élevées en automne.

Il est à noter que les mois d'été 2001 et le mois d'octobre 2002 se positionnent de manière intermédiaire par rapport à l'été 2002 et à l'automne 2001, ce qui met en évidence des différences de profil physico-chimique marquées d'une année à l'autre pour les périodes chevauchantes de cette étude.

Finalement, la température figure parmi les paramètres les plus structurants et ses variations apparaissent susceptibles d'influencer le profil saisonnier de réponse de l'activité MDMX en Moselle.



**Figure 58 :** Corrélation de Pearson calculées pour vérifier le degré de liaison entre l'activité MDMX en pmol.RB/min/org (exprimée en logarithme décimal) et la température de l'eau pour les trois sites naturels (La Maxe, Pierre La Treiche, Liverdun) et pour l'activité basale. Les coefficients de corrélation linéaire ( $r_{\text{Pearson}}$ ) sont indiqués sur chacun des graphiques. Ceux calculés pour les trois sites naturels sont significatifs ( $p < 0,05$ ).

**Tableau XIV :** Résultats de la régression multiple mettant en évidence la contribution relative de la température à la variation de la réponse de l'activité MDMX in situ. Le tableau indique les coefficients de corrélation partielle ( $r_{\text{Pearson}}$ ;  $\alpha=0,05$ ) obtenus pour chaque site et son niveau de significativité ( $p$ ).

Température	r	p
Ars Sur Moselle	0,02	0,89446
Hauconcourt	-0,12	0,48066
Pierre La Treiche	0,35	0,04264
Liverdun	0,20	0,25760



## 2 – Corrélation avec la température (Figure 58)

Nous avons cherché à préciser la relation pressentie entre la température et la réponse de l'activité MDMX chez les dreissènes transférées en Moselle. Les corrélations établies entre l'activité mesurée sur chaque site et la température de l'eau mesurée *in situ* lors du prélèvement des organismes se sont avérées significatives (Figure 58). Nous avons également appliqué ce traitement aux mesures de l'activité basale dont nous avons mesuré la corrélation avec la température de La Maxe au moment de leur prélèvement (huit jours avant). Conformément au résultat attendu, la corrélation n'est pas significative, indiquant que le processus de dépuración n'est pas influencé par la température du milieu d'origine.

## 3 – Régression linéaire multiple

Les résultats de l'ACP et les corrélations établies par la suite ont permis de dégager la température comme un paramètre semblant intervenir de manière prépondérante dans les variations de la réponse de l'activité MDMX. La réalisation d'une régression multiple a été envisagée afin de vérifier si cette hypothèse restait valide dans la mesure où la température était considérée de concert avec d'autres descripteurs de la physico-chimie.

Les résultats de cette analyse montrent que le paramètre température, lorsqu'il est intégré dans la physico-chimie globale, n'apparaît plus comme un facteur déterminant (Tableau XIV). En effet, le coefficient de corrélation partielle pour ce paramètre n'est significatif qu'à Pierre La Treiche.

Les coefficients de corrélation partielle ainsi que le niveau de significativité des autres paramètres physico-chimiques intégrés dans l'analyse sont présentés en annexe 10. L'ensemble des résultats fait apparaître que les paramètres les plus souvent liés à la réponse MDMX sont la demande biologique en oxygène, la chlorophylle a, le pourcentage de saturation en oxygène, les matières en suspension, la conductivité et les nitrites. A l'inverse, le pH ne s'est avéré structurant sur aucun des quatre sites étudiés dans cette analyse.

## IV – Bilan du suivi saisonnier

L'analyse de l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce suivi saisonnier de l'activité MDMX a permis de dégager plusieurs points intéressants.

### A – Transfert *in situ*

L'analyse globale des résultats obtenus fait apparaître une absence d'adéquation entre les niveaux d'activité mesurés sur la période de août à septembre sur les deux années consécutives. Les résultats montrant une corrélation positive marquée de l'activité MDMX avec la température lors du suivi *in situ* nous ont amenés à considérer comme atypiques les réponses obtenues sur la période de août à octobre 2001, pour laquelle l'activité mesurée est extrêmement faible alors que les températures sont relativement élevées. Les observations faites *in situ* tendent à confirmer cette hypothèse et laissent supposer que ces réponses atypiques aient pu être induites par un stress. En effet, une forte mortalité des dreissènes (de l'ordre de 50%) a ponctuellement été enregistrée suite au transfert sur les trois sites. Une mortalité aussi importante n'a que très rarement été observée lors des autres expérimentations de transfert menées *in situ*. C'est pourquoi, même si on ne peut complètement exclure l'existence d'un effet lié à l'encagement, nous avons supposé l'intervention d'autres facteurs pour expliquer à la fois la mortalité et l'altération de la réponse MDMX. Un des paramètres pouvant être considéré comme facteur aggravant du stress est la température de l'eau, qui peut atteindre 23 à 25°C pendant la période estivale. Outre les facteurs abiotiques, la physiologie des organismes est également à considérer. La période estivale, qui coïncide avec la période de maturité sexuelle et d'émission des gamètes, constitue généralement un stress important pour les dreissènes. L'évaluation des indices gonadiques de dreissènes encagées dans une autre portion de la Moselle aval au cours de l'année 2001 a montré que les mois de juillet à septembre correspondaient à la période d'émission des gamètes (EBSE-PEE, 2002). Ce stade du cycle reproducteur est une phase délicate pour les dreissènes qui investissent énormément d'énergie dans la maturation puis l'émission des gamètes. Dans de nombreux cas, la période de reproduction conduit à un affaiblissement, voire même à une mortalité des organismes (Sprung, 1992 ; Stoeckmann et Garton, 2001).

**Tableau XV :** Récapitulatif des limites de l'intervalle de confiance (90%) de la moyenne de l'activité basale et de l'activité MDMX évaluée chez les dreissènes implantées à La Maxe, Pierre La Treiche et Liverdun au cours du suivi (Activités exprimées en pmol.RB/min/org).

	Limite inférieure	Limite supérieure
Activité Basale	0	20,7
La Maxe	0	55,5
Pierre La Treiche	0	62,6
Liverdun	0	91,7

La superposition de l'ensemble des facteurs stressants cités précédemment (encagement, température de l'eau élevée et reproduction) a probablement entraîné une mortalité exceptionnelle et l'état d'affaiblissement des organismes survivants peut expliquer l'activité MDMX particulièrement faible obtenue à cette période. Parmi les résultats acquis, le cas du mois de décembre 2001 pour lequel toutes les activités mesurées étaient nulles, peut également s'expliquer par un affaiblissement des dreissènes exposées à cette période à des températures de l'eau extrêmement faibles (de l'ordre de 1 à 3°C). Ce résultat rejoint celui obtenu en laboratoire montrant une perturbation de l'activité MDMX, et une altération des conditions physiologiques chez des dreissènes exposées à une température de 4°C (Chapitre 3.2 § II).

## B – Comportement de l'activité basale

L'activité basale, correspondant au niveau d'activité présenté par les organismes autochtones de La Maxe après huit jours de dépuración en laboratoire, a été suivi en parallèle aux réponses de l'activité MDMX chez les dreissènes transférées *in situ*. Les résultats de cette étude ont montré que l'activité basale suit un profil de réponse similaire aux profils obtenus *in situ*, à la différence près que l'amplitude du profil est restée très faible par rapport aux autres (Tableau XV).

Même si des variations ont été relevées au sein de ce profil, seule la valeur mesurée au mois d'octobre s'est avérée particulièrement élevée. Dans ce cas, la question se pose de savoir si l'activité basale est réellement forte ou si la période de dépuración en laboratoire n'a pas été suffisamment longue pour permettre le retour au niveau basal.

Les valeurs acquises au cours de ce suivi, comprises dans l'intervalle 0 – 20,7 pmol.RB/min/org sont incluses dans l'intervalle 0 – 28,7 pmol.RB/min/org défini au cours de la synthèse présentée au chapitre 3.2 (§ III). Ce résultat renforce l'hypothèse alors émise selon laquelle il existerait une « gamme » d'activité basale relativement stable chez les dreissènes originaires de La Maxe.

Contrairement aux résultats obtenus chez les dreissènes transférées *in situ*, la corrélation entre l'activité MDMX et la température du milieu d'origine des dreissènes n'est pas significative. Ce résultat, tout à fait logique dans la mesure où les organismes sont extraits des influences de leur milieu, confirme l'intérêt et la pertinence du critère « activité basale » en tant que témoin théorique du niveau non induit du système MDMX.

## C – Comportement de l'activité MDMX *in situ*

### 1 – La Maxe, Pierre La Treiche et Liverdun

Le suivi de l'activité MDMX chez des dreissènes transférées sur les trois sites répartis en Moselle a montré une similitude des profils de réponse, mais des variations de leur amplitude. Globalement, l'activité est restée proche de son niveau basal pendant toute la première partie du suivi (août 2001 à mars ou mai 2002, selon le site considéré). Elle s'en écarte ensuite au cours de la seconde partie qui comprend les mois chauds de 2002. On peut donc considérer que l'activité est induite pendant cette période. L'amplitude de réaction est du même ordre à La Maxe et Pierre La Treiche (Tableau XV) et est 2,7 à 3 fois supérieure à celle de l'activité basale. A Liverdun, l'activité MDMX peut atteindre des niveaux 4,5 fois supérieurs à ceux de l'activité basale (Tableau XV). En suivant le raisonnement appliqué pour l'activité basale, on pourrait suggérer l'existence d'une gamme de réponses sur chacun des sites étudiés. Cette gamme existe probablement, cependant elle apparaîtrait sûrement plus variable. En effet, s'il a été montré que les facteurs du milieu tels que la température n'influençaient pas l'activité basale, il en est tout autrement pour la réponse obtenue sur les sites naturels : les résultats de cette étude montrent en effet que l'activité MDMX semble intégrer les fluctuations du milieu naturel.

La similitude des résultats obtenus à La Maxe et Pierre La Treiche suggèrent que le transfert des dreissènes sur des sites présentant des différences du point de vue des caractéristiques physico-chimiques n'a pas été un élément perturbateur de la réponse de l'activité MDMX. On a cependant obtenu des résultats différents au niveau de l'amplitude de réaction entre Pierre La Treiche et Liverdun, qui sont pourtant des sites très proches sur le plan physico-chimique. Partant de ce constat, il semble légitime de s'interroger à propos de l'influence des micropolluants présents à des niveaux parfois élevés sur ce site. La non disponibilité d'une partie des données concernant ces micropolluants à Liverdun et l'absence de relevés effectués sur les autres sites étudiés n'ont pas permis de les inclure dans les analyses statistiques, ce qui ne permet pas de conclure à ce sujet.

## 2 – Existe-t-il un cycle saisonnier de l'activité MDMX chez *Dreissena polymorpha* ?

Des travaux menés chez des bivalves marins ont suggéré l'existence d'un cycle saisonnier de l'activité MDMX (Minier *et al.*, 1999, 2000 ; Keppler et Ringwood, 2001a, b). Alors que ces travaux ont été effectués à partir d'organismes prélevés *in situ*, notre approche a consisté à opérer le suivi à partir d'un pool d'organismes provenant de la même population et encagé sur trois sites différents d'une même rivière. Cependant, les résultats sont tout à fait comparables dans la mesure où des profils saisonniers similaires ont été mis en évidence dans les deux types de milieux et selon les deux approches. D'un point de vue global, les résultats obtenus en milieu marin montrent d'une part, un niveau d'expression des Pgps-like plus élevé pendant la période estivale et d'autre part, l'existence d'une corrélation significative entre la réponse et la température (Minier *et al.*, 1999, 2000 ; Keppler et Ringwood, 2001a, b). Cette corrélation mise en évidence *in situ* est validée par des travaux en laboratoire qui ont montré l'action inductrice de la température (Eufemia et Epel, 1998, 2000). Cette hypothèse n'a pas été vérifiée chez *Dreissena polymorpha* puisque l'exposition en laboratoire à des températures élevées (22 et 29°C, Chapitre 3.2 § II) n'a pas occasionné d'induction de l'activité. Toutefois, nos résultats complètent les observations faites *in situ* quant à la relation entre la température et l'activité. Certes, la température est un facteur important, mais lorsqu'elle est replacée dans la physico-chimie globale du milieu, elle apparaît comme un élément intégré dans un ensemble de paramètres, qui par le biais de leurs interactions réciproques et de leurs interactions avec le milieu peuvent influencer les variations de l'activité MDMX. En effet, les variations saisonnières de la température sont fortement liées à l'évolution des autres paramètres caractérisant le milieu. L'augmentation de la température en été coïncide par exemple avec l'augmentation de la production primaire et l'apparition de blooms phytoplanctoniques, qui pourraient également être impliqués dans l'induction de l'activité MDMX à cette saison (Minier *et al.*, 1999 ; Eufemia *et al.*, 2002).

L'étude des variations saisonnières de la réponse du système MDMX en milieu marin a été effectuée à partir d'organismes provenant aussi bien de sites non pollués que de sites pollués. Dans les deux cas, le cycle saisonnier mis en évidence était du même ordre (Minier *et al.*, 2000 ; Keppler et Ringwood, 2001a, b).

Finalement, nos résultats ont permis de suggérer l'existence d'une évolution saisonnière de l'activité MDMX en milieu dulçaquicole. Ils soulignent de surcroît l'importance des facteurs physico-chimiques du milieu dans les variations de la réponse du système de défense.

### Résumé

- Ce suivi a permis la mise en évidence de variations saisonnières des niveaux d'activité MDMX, qui apparaissent comme fortement liées à l'évolution saisonnière du milieu naturel.
- Les niveaux d'activité sont plus élevés en été.
- Les variations de l'activité MDMX sont corrélées avec celles de la température du milieu, mais les résultats de la régression multiple ont précisé que d'autres paramètres tels que la demande biologique en oxygène ou la teneur en chlorophylle a sont susceptibles d'expliquer ces variations.

## CHAPITRE 4 : DISCUSSION GENERALE



L'objectif du travail présenté était de déterminer l'aptitude du système MDMX étudié chez *Dreissena polymorpha* à constituer un biomarqueur pertinent pour le suivi de la qualité des milieux dulçaquicoles. Dans ce but, notre travail a consisté dans un premier temps à adapter la méthode d'efflux à l'évaluation de l'activité MDMX chez la dreissène. Après avoir vérifié son inductibilité *in situ*, l'essentiel du travail s'est orienté vers l'étude de sa réponse dans différentes conditions de stress.

### I – Activité basale

La synthèse des résultats concernant la dépuration de l'activité MDMX chez les dreissènes autochtones de La Maxe a permis de distinguer deux niveaux d'activité caractéristiques de cette population.

Le niveau d'activité initiale mesuré directement chez les dreissènes prélevées pourrait être assimilé à un « **niveau basal de terrain** ». En effet, il peut se définir comme un niveau partiellement induit correspondant au niveau de protection nécessaire à la survie sur le site étudié. Nous avons montré que ce niveau était variable au fil du temps (Chapitre 3.2) dans une même population de dreissènes (échelle intra-populationnelle). D'autres travaux ont montré que ce niveau pouvait varier à l'échelle intra- et/ou interspécifique (Kurelec et Pivcevic, 1991 ; Kurelec *et al.*, 1995b ; Minier *et al.*, 1993 ; Kurelec *et al.*, 1996a ; Smital et Kurelec, 1998b). La mise en évidence de ce niveau basal de terrain chez un grand nombre d'êtres vivants a suggéré l'hypothèse selon laquelle ce système puisse exister de manière constitutive chez toutes les espèces (Kurelec, 1992 ; Kurelec *et al.*, 1995b). Une autre hypothèse avancée est celle de l'existence de très faibles niveaux de MDMX chez tous les organismes aquatiques, qu'on ne puisse détecter que lorsqu'ils sont anormalement élevés (Epel, 1998).

Le niveau d'activité dépurée mesuré chez les dreissènes de La Maxe ayant passé huit jours en conditions contrôlées en laboratoire a été assimilé à un « **niveau basal théorique** ». Le niveau basal théorique peut se définir comme le niveau le plus bas que

puisse atteindre l'activité MDMX dans des conditions contrôlées en absence de composés substrats. Les résultats obtenus au cours de ce travail tendent à appuyer l'hypothèse de la stabilité du niveau basal au sein d'une même population. En effet, nous avons suggéré l'existence d'une « gamme » d'activité basale relativement stable se situant entre 0 et 28,7 pmol.RB/min/org chez les dreissènes originaires de La Maxe. Alors que nos résultats avancement l'hypothèse de l'existence d'un niveau basal théorique stable au sein d'une population, d'autres travaux ont montré que ce niveau était variable selon les espèces considérées et qu'il semblait relié au degré de tolérance des organismes à contamination de leur milieu d'origine (Smital *et al.*, 2000b).

La difficulté voire l'impossibilité de disposer d'un site naturel que l'on puisse considérer comme référence, et en conséquence la difficulté d'obtenir un niveau d'activité MDMX de référence non induit (Kurelec *et al.*, 2000) justifie et souligne l'intérêt de disposer du niveau basal théorique ou activité basale comme critère de comparaison et de référence pour estimer l'importance d'une réaction d'induction.

## II – Activité MDMX : quelle réaction et comment interpréter cette réaction ?

### A – Capacités de réaction

#### 1 – Induction de l'activité MDMX

L'induction de l'activité MDMX chez des dreissènes exposées à un stress chimique se traduit par un accroissement de l'activité d'efflux des xénobiotiques. En ce sens, l'induction mesurée traduit la nécessité d'accroître le niveau de défense contre un environnement agressif.

##### 1.1 – Temps de réponse

Une induction de l'activité MDMX chez des moules marines *Mytilus galloprovincialis* transférées sur un site contaminé a été mise en évidence dès 3 jours d'exposition (Kurelec,

**Tableau XVI :** Synthèse des facteurs d'induction obtenus lors des expérimentations in situ. Les facteurs d'induction pour chaque expérimentation, chaque site d'étude (lignes) et chaque durée d'exposition (colonne, E3, E8...) sont calculés par rapport à l'activité basale mesurée avant implantation. NB : Rappelons que l'amplitude de l'induction exprimée sous cette forme ne tient pas compte de la variabilité de la réponse, et un facteur d'induction élevé ne correspond pas systématiquement à une réaction significative.

		E3	E8	E14	E21	E28
Fensch	Amont	1,93	1,03	0,48		
	Aval 1	1,74	1,46	1,72		
	Aval 2	3,02	2,47	2,89		
Ton In Situ A	Amont				3,07	
	Aval 1				4,51	
	Aval 2				4,71	
Ton In Situ B	Amont	0,93		2,02	4,06	
	Aval 1	0,66		2,47	2,96	
Chooz juillet	Amont			4,47		2,84
	Aval 1			2,63		5,91
	Aval 2			3,55		3,24
Chooz octobre	Amont			4,18		5,50
	Aval 1			4,28		5,54
	Aval 2			2,89		2,34

**Tableau XVII :** Synthèse des facteurs d'induction obtenus lors des expérimentations en laboratoire. Les facteurs d'induction pour chaque expérimentation, chaque dose (lignes) et chaque durée d'exposition (colonne, E1, E3...) sont calculés par rapport à l'activité basale mesurée avant exposition ou par rapport à l'activité mesurée dans le milieu témoin (eau déchlorée). NB : Rappelons que l'amplitude de l'induction exprimée sous cette forme ne tient pas compte de la variabilité de la réponse, et un facteur d'induction élevé ne correspond pas systématiquement à une réaction significative.

		Induction / activité basale							Induction / témoin							
		E1	E3	E5	E6	E8	E11	E12	E1	E3	E5	E6	E8	E11	E12	
rhodamine B	5µM	2,3		10,9		10,6	7,5		0,58		1,12		1,52	1,82		
	50µM	18,7		30,8		19,0			4,80		3,16		2,72			
Fuel Oil A	0,1µg/L									1,63			1,17			
	10µg/L									4,96			0,69			
Fuel Oil B	0,1µg/L								1,20		1,91			3,09		
	5µg/L								0,77		0,95			1,77		
Eau (Ton)	685 µgCl/L				2,12			2,79				1,97			1,81	
Eau (Thur)	/		0,51							0,57						

1995b). Dans le cadre de nos travaux, le transfert de dreissènes *in situ* a permis de localiser l'apparition de la réaction du système MDMX entre 3 et 14 jours. La réaction la plus précoce s'est produite après transfert des dreissènes dans la Fensch (Chapitre 3.3 § II-A) qui est un des cours d'eau les plus dégradés parmi ceux étudiés et qui présente la pollution la plus complexe. Ces résultats suggèrent que la réaction soit d'autant plus précoce que la perturbation est importante. Cette hypothèse est appuyée par les résultats obtenus en laboratoire qui ont montré une induction de l'activité MDMX dès 24 heures d'exposition dans les milieux les plus contaminés (Chapitre 3.3 § I-A). Alors qu'en laboratoire la réaction observée ne s'est pas toujours maintenue dans le temps (Chapitre 3.3 I-B), les travaux réalisés *in situ* ont mis en évidence le maintien (ou l'amplification) de l'induction jusqu'à 21 et 28 jours (Chapitre 3.3 § II-B & C). Des travaux menés chez l'huître *Crassostrea virginica* n'ont montré aucune induction du niveau d'expression des protéines MDMX chez des individus exposés sur des sites contaminés pendant 30 jours (Ringwood *et al.*, 1999), suggérant que le temps de réaction puisse varier selon les espèces, les sites d'étude, et peut-être selon les méthodes d'évaluation de l'induction du système MDMX.

La réaction d'induction du système MDMX apparaît finalement comme un phénomène relativement précoce et capable de réagir rapidement afin d'accroître le niveau de protection des organismes exposés. Nos résultats de terrain ont en outre montré que ce niveau accru de protection peut être maintenu dans le temps si l'exposition se prolonge. Ces observations justifient l'idée que le MDMX représente un système de défense de première ligne important pour la protection des organismes et confirment l'intérêt d'étudier cette réponse précoce qui est susceptible de détecter rapidement l'existence d'un stress subi par les organismes.

## 1.2 – Amplitude de la réponse

Les tableaux XVI et XVII présentent une synthèse des facteurs d'induction calculés à partir des résultats obtenus sur le terrain et en laboratoire.

Le bilan des expérimentations réalisées sur des dreissènes encagées *in situ* montre une amplitude maximale de réaction évaluée à 6 (Tableau XVI). D'un point de vue global, les facteurs d'induction sont d'autant plus élevés que la durée d'exposition augmente. L'amplitude de la réaction n'augmente pas systématiquement selon le gradient amont aval

dans la mesure où il s'est avéré *a posteriori* que ce gradient ne reflétait pas toujours un gradient de contamination.

Le bilan des expérimentations en laboratoire montre des amplitudes de réactions globalement inférieures et beaucoup plus hétérogènes (Tableau XVII). En exprimant l'induction par rapport à l'activité basale, on a pu observer des inductions très marquées. Bien que ces résultats extrêmes ne reflètent pas systématiquement un effet significatif, ils soulignent toutefois l'existence d'une amplitude de réponse potentiellement très importante. En exprimant ces résultats par rapport à ceux obtenus dans les témoins non exposés, il apparaît que les facteurs d'induction reflètent les mêmes effets, tout en étant plus faibles. Ces résultats sous-entendent qu'il est possible d'observer une légère réaction de l'activité dans les milieux témoins, soulignant la difficulté de garantir en laboratoire un milieu témoin exempt de stress.

L'analyse des résultats publiés dans la littérature (Chapitre 1, § III-D-2, Tableau VI) a montré la difficulté de résumer et de comparer l'ensemble des données en raison de l'hétérogénéité des méthodes mises en œuvre, des paramètres mesurés et de la diversité des organismes étudiés. On peut toutefois constater que les exemples cités dans le tableau font état d'amplitudes variables mais globalement plus faibles que celles obtenues chez la dreissènes par la méthode d'efflux.

Malgré une variabilité importante en laboratoire, l'amplitude de réponse semble potentiellement élevée. *In situ*, elle est apparue plus réduite, mais significative. En conséquence et suite aux comparaisons effectuées avec les données extraites de la littérature, il semble que la mesure de l'activité MDMX par la méthode d'efflux permette de faire apparaître clairement une réaction d'induction.

L'intérêt que représente la connaissance de l'amplitude de réaction réside dans la possibilité de connaître les capacités de défense maximale des organismes afin de mieux interpréter les données acquises *in situ*. Pour préciser les données concernant cette amplitude, il serait intéressant de disposer d'études consistant à exposer au même stress plusieurs populations d'une même espèce, mais d'origines différentes et différentes espèces de même origine. Obtiendrait-on des capacités d'induction variables selon les espèces et/ou variables selon l'origine et la sensibilité des différentes populations ? A notre

connaissance, ce type d'étude n'a pas encore été mis en œuvre et la question de la capacité de réaction et de l'amplitude de cette réaction est toujours d'actualité.

### 1.3 – Variabilité de la réponse

A plusieurs reprises au cours des expérimentations en laboratoire et *in situ*, il a été mentionné l'existence d'une importante variabilité des niveaux d'activité MDMX mesurés chez les dreissènes exposées à des situations stressantes. Etant donné que la méthode d'efflux utilisée pour évaluer l'activité permet la répétition des dosages sur les mêmes lots d'organismes, nous avons pu constater l'augmentation de la variabilité de la réponse entre les mesures effectuées avant et après exposition. Ce constat suggère que la variabilité mise en évidence ne soit pas due à l'hétérogénéité des lots de dreissènes mais plutôt à l'hétérogénéité de leurs réponses en conditions stressantes. Ce phénomène d'augmentation de la variabilité de la réponse du système MDMX chez les organismes provenant des sites les plus contaminés a également été mis en évidence chez l'huître *Crassostrea virginica* (Keppler et Ringwood, 2001b) et chez plusieurs espèces de poissons (Bard, 2000). La prise en compte de cette variabilité constitue un complément pour l'interprétation de la réponse de l'activité MDMX et permet de mieux l'intégrer dans un ensemble de processus physiologiques de réaction face à un environnement stressant. A ce sujet, deux modèles ont été établis. Le premier suggère que la variabilité la plus élevée est caractéristique des milieux contaminés, où les organismes répondent différemment au stress qu'ils subissent, en fonction de leur sensibilité (Depledge et Lundebye, 1996). Le second modèle prédit le phénomène opposé, à savoir une variabilité d'autant plus réduite que le milieu est contaminé. Selon ce modèle, la variabilité naturelle est réduite lorsque le facteur pollution contrôle le milieu, forçant les organismes à réagir dans une gamme réduite de réponses (Luoma, 1996).

Bien que ces modèles s'appliquent à des populations naturelles considérées dans leur milieu et non à des populations encagées ou maintenues en laboratoire lors d'expérimentations à court terme, on peut souligner que nos observations rejoignent le plus souvent le modèle de Depledge et Lundebye (1996).

Cependant, le transfert de dreissènes dans une rivière fortement contaminée (la Fensch, Chapitre 3.3 § II-A) a conduit dans un premier temps à une augmentation importante de la variabilité, qui s'est par la suite considérablement réduite sur un temps court chez les

organismes exposés sur les sites les plus contaminés. La forte mortalité occasionnée par l'exposition sur ces sites a probablement conditionné une homogénéité des réponses en sélectionnant les organismes les plus résistants. Dans cette situation, on se rapproche du modèle de Luoma (1996), dans la mesure où on considère le facteur pollution comme contrôlant la survie et la réponse des organismes les plus résistants.

## 2 – Réversibilité de l'induction de l'activité MDMX

L'étape de dépuration post-exposition, qui a consisté à replacer les organismes dans un milieu exempt de composés substrats suite à une phase d'exposition, a permis de mettre en évidence la réversibilité de l'induction mesurée. L'activité MDMX diminue après la cessation de l'exposition, soulignant la capacité du système MDMX à réagir aux variations des conditions de milieu. La protection accrue conférée par l'activation du système MDMX n'étant plus nécessaire en absence de composés substrats ou de stress environnemental, l'activité est réduite et retrouve en 6 à 12 jours un niveau équivalent à celui mesuré avant exposition. Très peu de travaux ont été consacrés à la réversibilité de l'induction du système MDMX. Cet aspect a toutefois été abordé lors d'une étude de transfert *in situ* au cours de laquelle des moules marines provenant d'un site contaminé ont été exposées pendant 4 jours sur un site non contaminé. Les auteurs ont ainsi mis en évidence une diminution de l'activité MDMX jusqu'à un niveau équivalent à celui mesuré chez les organismes autochtones du site non contaminé, démontrant la réduction du processus de défense quand les conditions s'améliorent (Smital et Kurelec, 1998b). En revanche, alors que nos travaux ont montré une réversibilité de l'induction suite à des expositions en laboratoire, une activité d'efflux accrue a été maintenue chez des moules marines après cessation de l'exposition à un milieu contaminé par la vincristine (Minier et Moore, 1996).

## B – Relation entre exposition et réponse

La littérature présente des exemples de résultats ayant mis en évidence l'existence d'une corrélation entre les niveaux d'activité présentés par des organismes prélevés dans les milieux naturels (niveau basal de terrain) et la contamination de ces milieux (Minier *et al.*,

1993 ; Kurelec *et al.*, 1996a). Cependant, il s'est avéré que cette corrélation est loin d'être systématique, rendant ainsi plus complexe l'interprétation des données acquises sur le terrain (Minier *et al.*, 1993, 2000 ; Bresler *et al.*, 1999 ; Keppler et Ringwood, 2001b).

L'ensemble de nos travaux reflète également une certaine disparité des résultats. Ainsi, un gradient de réponse de l'activité MDMX évaluée chez la dreissène a été obtenu suite au transfert le long d'un gradient de pollution (Chapitre 3.3 § II-A). L'étude effectuée sur le Ton, rivière caractérisée par la présence d'effluents papetiers, a montré une induction significative de l'activité MDMX liée à la mauvaise qualité générale du cours d'eau, sans qu'elle puisse être corrélée aux concentrations en AOX, bien que ce paramètre constitue un bon descripteur de la pollution caractéristique de ce cours d'eau (Chapitre 3.3 § II-C). Dans certains cas, une induction a été obtenue sur des sites considérés comme de bonne qualité par la BERM.

L'absence de corrélation significative entre l'induction et la contamination des sites naturels peut toutefois s'expliquer par la difficulté de disposer d'un paramètre de contamination globale. En effet, la contamination des milieux aquatiques est généralement évaluée par le dosage de quelques composés ou par la réaction de biomarqueurs plus ou moins spécifiques d'une catégorie de contaminants. Cependant, le MDMX est défini comme un mécanisme de défense global qui réagit face à un cumul de composés organiques, comprenant aussi bien des contaminants anthropiques que des substances naturelles. Par conséquent, il n'apparaît pas surprenant qu'une corrélation entre l'induction de l'activité MDMX et un ou plusieurs indicateurs (biologiques ou physico-chimiques) de la contamination des eaux soit difficile à établir de manière certaine (Kurelec *et al.*, 1998). Ceci explique également l'obtention de niveaux induits sur des sites considérés comme de bonne qualité. En effet, transférer des organismes en milieu naturel, même sur des sites de bonne qualité revient tout de même à les exposer à des composés substrats naturellement présents dans le milieu et susceptibles de provoquer une réaction du système de défense.

Les résultats que nous avons obtenus en laboratoire montrent que, même si une augmentation de la réaction en fonction de la dose est observée, elle n'est pas toujours significative en raison d'une forte variabilité des résultats. Dans certains cas, une absence de réaction ou une réduction de cette réaction suite à l'exposition à de fortes doses ont pu être observées ; ce phénomène est probablement attribuable à une perturbation importante de la physiologie des organismes ou peut-être à l'apparition d'effets toxiques. En revanche,



l'exposition de bivalves marins à différents contaminants a permis l'obtention d'une relation entre la réponse mesurée et les doses d'exposition appliquées (Minier et Moore, 1996 ; Eufemia et Epel, 2000).

Même si l'ensemble de nos résultats montre que l'induction est généralement observée suite à l'exposition à une charge organique polluante, il reste néanmoins à déterminer s'il est possible d'établir précisément une relation dose-réponse.

### C – Saturation de l'activité MDMX et mesure du potentiel inhibiteur

L'absence de corrélation entre la réponse du système MDMX et le niveau d'exposition, et plus particulièrement, l'obtention de réponses étonnamment faibles dans le cas d'exposition à des fortes doses de composés substrats en laboratoire (chez des poissons ; Doi *et al.*, 2001 ; Sturm *et al.*, 2001) ou *in situ* (chez des poissons et des bivalves ; Kurelec *et al.*, 1996 ; Bresler *et al.*, 1999 ; Keppler et Ringwood, 2001b ; Bard *et al.*, 2002) a été associée à un processus de saturation du système de défense.

La méthode d'évaluation du potentiel inhibiteur (PI) permet d'estimer la présence de composés substrats capables de saturer le système MDMX dans des échantillons d'eaux de surface (Kurelec *et al.*, 1995a) ou d'eaux interstitielles (Toomey et Epel, 1993). Elle est décrite comme une méthode particulièrement sensible, simple, rapide et non destructive. De plus, elle permet de travailler dans des conditions très proches de celles rencontrées dans le milieu naturel puisqu'elle consiste simplement à exposer des organismes vivants à des échantillons d'eau naturelle au cours de l'efflux (Smital et Kurelec, 1997).

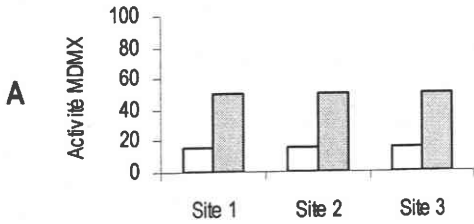
Ainsi, l'utilisation de cette méthode au cours de deux expérimentations (Chapitre 3.3 § II-C) a permis de détecter la présence d'une charge substrat généralement plus élevée en aval qu'en amont des rejets industriels ciblés. Des résultats similaires ont été obtenus à partir d'eau prélevée en amont et en aval d'un rejet d'eaux usées (Kurelec *et al.*, 1998). Nos résultats ont également montré que, si la réponse mesurée semble effectivement liée aux niveaux de contamination des eaux testées, elle n'apparaît pas directement corrélée au niveau d'AOX mesurés sur les sites. Les travaux de Kurelec *et al.* (1998) ont abouti au même constat en montrant que le PI d'eaux naturelles évalué chez la dreissène n'était corrélé ni aux niveaux d'indicateurs classiques de la contamination des eaux (mutagénicité,

induction de l'activité benzo[a]pyrène monooxygénase), ni aux concentrations de 48 hydrocarbures aromatiques polycycliques. Cette absence de corrélation s'explique par la non spécificité du système MDMX qui prend en charge une grande variété de composés organiques (Smital et Kurelec, 1998a ; Bard, 2000). Il n'est donc pas surprenant que la mesure d'un ou plusieurs paramètres témoin de la contamination des eaux ne soit pas directement reliée au potentiel des eaux à inhiber le système MDMX. En résumé, la mesure du PI permet de comparer les charges organiques substrats de plusieurs eaux, mais sans permettre de rapporter les résultats à des paramètres physico-chimiques quantitatifs connus de manière directe et certaine. Cependant, cette méthode présente un intérêt en tant que méthode d'évaluation précoce de l'exposition. Les résultats obtenus dans le cadre de l'étude du Ton (Chapitre 3.3 § II-C) ont permis la mise en évidence de la saturation des capacités du système MDMX en montrant que le PI de l'eau prélevée en aval du rejet de la papeterie était maximal. L'obtention de ce résultat a permis d'émettre une hypothèse pouvant expliquer la réaction de l'activité MDMX mesurée chez les dreissènes transférées sur le site considéré, soulignant ainsi l'intérêt que peut présenter la combinaison de ces deux évaluations, l'une renseignant sur la quantité de substrat potentielle et l'autre sur le niveau d'activation correspondant.

#### **D – Variations saisonnières**

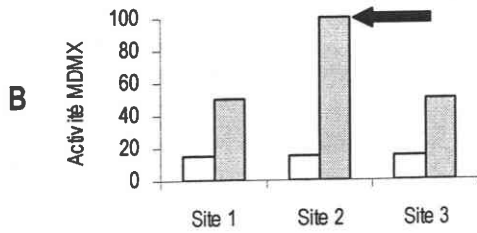
La connaissance des variations saisonnières de l'activité MDMX en relation avec l'évolution saisonnière des caractéristiques du milieu et en relation avec la physiologie des organismes est primordiale pour améliorer l'interprétation des résultats (Sheehan et Power, 1999). Les résultats de suivis saisonniers en milieu marin (Minier *et al.*, 1999, 2000 ; Keppler et Ringwood, 2001a, b) et ceux que nous avons obtenus chez la dreissène en milieu dulçaquicole montrent en effet une activation du système MDMX pendant la période estivale. La mise en évidence d'une activité MDMX élevée pendant les mois chauds pose la question de savoir si cette activité est proche de son maximum pendant ces périodes. Dans ce cas, la capacité d'induction est probablement réduite, ce qui suppose qu'en cas d'apparition d'un stress lié à une charge organique toxique, le MDMX pourrait se trouver saturé et l'apparition d'effets toxiques n'en serait que plus rapide (Minier *et al.*, 1999).

□ Niveau basal  
 ■ Niveau mesuré *in situ*



**A – Situation de référence**

Le niveau de défense mesuré *in situ* correspond à l'activation engendrée par la différence de stress entre laboratoire et terrain (↗ charge organique)



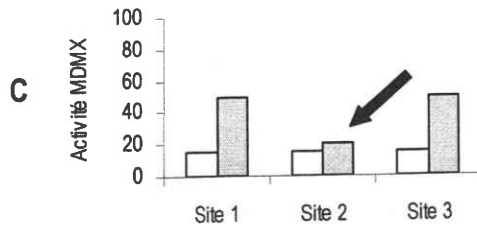
**B – Situation de stress au niveau du SITE 2**

Le niveau de défense est induit par rapport à la situation de référence

↗ charge organique

↗ stress

Probabilité de la saturation



**C – Situation de stress au niveau du SITE 2**

Le niveau de défense est réduit par rapport à la situation de référence

➤ Dilution de la charge organique

➤ Altérations des capacités de réponse

Saturation du système de défense et des capacités d'efflux

→ Accumulation cellulaire de xénobiotiques

→ toxicité ?

**Figure 59 :** Schéma théorique des réactions de l'activité MDMX (exprimée en unités arbitraires) mesurée chez des organismes transférés *in situ*. Ce schéma synthétise les situations rencontrées et les hypothèses qui ont été émises concernant leur interprétation.

Nos travaux se sont axés sur la mise en évidence des paramètres physico-chimiques influençant les variations saisonnières de l'activité, tels que la température du milieu, la charge organique ou le développement phytoplanctonique. Ces paramètres peuvent exercer une action directe sur le système MDMX dans la mesure où ils se sont avérés capables d'induire ou d'interagir avec le système lors d'exposition contrôlées (Smital *et al.*, 1996 ; Eufemia et Epel, 1998, 2000 ; Schröder *et al.*, 1998 ; Eufemia *et al.*, 2002). Ces paramètres peuvent de surcroît exercer une action indirecte en influençant par exemple la disponibilité en nourriture, le taux de filtration chez les bivalves ou le déclenchement et le déroulement du cycle reproducteur. L'ensemble de ces effets indirects peuvent influencer l'état physiologique des organismes et en conséquence altérer ou renforcer le niveau de défense MDMX par le jeu des régulations de la balance énergétique (Epel, 1998 ; Epel et Eufemia, 1998)

### III – Hypothèses pour l'interprétation de la réponse du système MDMX *in situ*

Imaginons une situation dans laquelle on souhaite réaliser la surveillance d'un cours d'eau en suivant l'évolution de la réponse du système MDMX par rapport à une situation de référence qui peut être l'évolution du système sur un site de référence valide (si tant est qu'on puisse encore disposer d'un tel site) ou la situation de ce même cours d'eau avant une modification susceptible de générer l'apparition d'une pollution.

La méthode de suivi proposée est le transfert de dreissènes provenant d'une population homogène sur trois sites.

L'ensemble de nos travaux, ainsi que les réflexions publiées dans la littérature nous ont amené à distinguer trois types de réponses, représentées sur la figure 59.

Il est à noter que le schéma proposé ici est un schéma théorique visant à synthétiser les situations rencontrées, à résumer les hypothèses qui ont été émises concernant leur interprétation et à soulever les questions encore posées. Etant théorique, il est évidemment simplifié et non exhaustif.

La première situation décrite (Figure 59-A) sera considérée comme la situation de référence en supposant que l'induction modérée du niveau de défense soit assimilable à

une réaction d'acclimatation des organismes engendrée par le transfert dans le cours d'eau, qui aussi peu pollué soit-il, contiendra toujours une charge organique substrat du système MDMX. Sur cette base, le niveau de défense atteint peut être considéré comme le niveau basal de terrain (ce chapitre, § I-A) que l'on supposera identique sur les trois sites étudiés. Ces considérations sous-entendent qu'il est nécessaire de connaître ce niveau basal de terrain.

La seconde situation décrite (Figure 59-B) correspond au cas où l'activité mesurée sur un site est plus élevée que la situation de référence et/ou plus élevée que sur les autres sites. Cette induction reflète une activation anormale du système de défense signalant la survenue d'un stress et/ou l'augmentation de la charge organique substrat. On peut toutefois supposer que tant que le système n'est pas saturé, les organismes sont toujours capables de se défendre et de gérer la charge organique. Cependant, il est nécessaire de connaître le niveau d'induction maximale au delà duquel le système risque de saturer et de ne plus pouvoir gérer la charge organique.

La dernière situation décrite (Figure 59-C) correspond à une réduction du niveau de défense MDMX par rapport à la situation de référence et/ou par rapport aux autres sites. L'hypothèse d'une dilution de la charge organique ne peut être exclue, bien qu'elle ne soit probablement pas la plus réaliste dans le cas d'un cours d'eau. Cette situation reflète plutôt une altération des capacités de défense des organismes et apparaît alors comme la plus critique dans la mesure où le système MDMX étant saturé, la sensibilité aux xénobiotiques toxiques est restaurée. L'accumulation cellulaire de composés toxiques est susceptible d'engendrer l'apparition d'effets délétères à plus ou moins long terme si les autres mécanismes de défense cellulaires ne parviennent pas à gérer ce stress toxique (Epel, 1998). Pour définir plus précisément cette situation, il faudrait connaître les étapes susceptibles de se dérouler entre l'induction forte, l'induction maximale, la saturation et la survenue d'effets toxiques. En effet, bien que des travaux aient évalué l'impact de la saturation du MDMX en terme d'effets toxiques (Waldmann *et al.*, 1995 ; Smital et Kurelec, 1998a ; Britvic et Kurelec, 1999) on ne connaît que très peu le comportement de l'activité MDMX à cette étape.

Si on ne peut encore correctement interpréter la réaction du système MDMX *in situ* en terme d'effets engendrés par la présence de chimiosensibilisants, il est toutefois possible

d'évaluer biologiquement l'exposition des organismes à ces composés en estimant leurs niveaux dans les eaux naturelles (Kurelec *et al.*, 2000).

Il est en effet apparu informatif de combiner l'utilisation du PI et la mesure de l'activité MDMX afin de mieux interpréter les résultats obtenus après transfert d'organismes *in situ*. Ainsi, une forte induction mesurée sur un site présentant une faible charge organique substrat pourrait indiquer l'intervention d'un autre type de stress dans la réponse. Il a en effet été montré que le système MDMX pouvait être induit par des composés non substrats et par des chocs thermiques (Eufemia et Epel, 1998, 2000). Au contraire, une absence ou une réduction de la réaction sur un site présentant une charge substrat élevée pourrait sous-entendre une saturation du mécanisme de défense.

L'ensemble du schéma décrit sur la figure 59 reste toutefois à compléter puisqu'il n'intègre ni les variations de sensibilité des organismes (puisque nous avons considéré que la population étudiée était homogène), ni les variations de l'activité liées au cycle saisonnier des conditions du milieu et au cycle physiologique des organismes.

## CHAPITRE 5 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CHAPITRE 5.1 : CONCLUSIONS

CHAPITRE 5.2 : PERSPECTIVES

## Chapitre 5.1 : Conclusions

### **Le système MDMX chez *Dreissena polymorpha* peut-il constituer un biomarqueur pertinent ?**

La synthèse des résultats obtenus (Chapitre 3), de l'interprétation qui pouvait en être faite (Chapitre 4) par rapport aux résultats décrits dans la littérature (Chapitre 1) nous amènent maintenant à tenter d'apporter des éléments de réponse à la question qui a été posée au commencement de ce travail à savoir :

#### **Le système MDMX étudié chez la dreissène peut-il constituer un biomarqueur pertinent ?**

Afin de structurer ces éléments de réponse, nous allons vérifier si les principaux résultats de ce travail s'intègrent dans la notion de biomarqueur (Lagadic *et al.* 1997a) :

**« Un biomarqueur peut se définir comme un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental... »**

Le bilan des travaux effectués a montré que l'activité MDMX, un processus biochimique opérant au niveau des membranes cellulaires était modulable en fonction des modifications du milieu et que cette modulation pouvait être mesurée à l'échelle de l'organisme. L'étude de la dépuraison de l'activité MDMX a révélé l'existence d'un niveau basal de cette activité dans la population de dreissènes étudiée. L'inductibilité du système a été mise en évidence sur le terrain et en laboratoire lors de l'exposition à différents stress. Cette réaction apparaît en 3 à 14 jours *in situ* et dès 24 heures d'exposition en laboratoire. L'amplitude de la réaction est suffisante pour être distinguée du niveau de base. L'induction observée à la fois *in situ* et en laboratoire s'est avérée réversible.

**« ...qui révèle l'exposition présente ou passée à au moins une substance chimique à caractère polluant. »**

L'ensemble des travaux a permis la mise en évidence de l'induction suite à l'exposition à différents types de milieux chargés en composés substrats du MDMX :



- colorant fluorescent (laboratoire)
- pollution de type hydrocarbures (laboratoire)
- pollution complexe caractérisée par de fortes concentrations en composés organohalogénés (*in situ*)
- pollution « cocktail » (*in situ*)
- milieux naturels peu contaminés (*in situ*)

Il a ainsi été montré que le système MDMX est capable de réagir en présence de pollution. Cependant cette réaction apparaît non spécifique dans la mesure où le système de défense peut également être activé dans des milieux peu contaminés. Comme nous l'avons déjà évoqué, le milieu naturel aussi peu contaminé soit-il, contiendra toujours une charge organique substrat du MDMX. Par conséquent si on parvient à distinguer la réponse « naturelle » de la réponse engendrée par une contamination excessive, il sera possible d'utiliser l'induction de l'activité MDMX comme témoin de « l'exposition à au moins une substance chimique à caractère polluant » (Lagadic *et al.*, 1997b).

### Quel type de biomarqueur peut-il incarner ?

Les propriétés du MDMX et sa place au sein de la défense cellulaire en font un mécanisme de défense de première ligne, protégeant les organismes contre l'entrée et l'accumulation des xénobiotiques dans les cellules et limitant ainsi leurs éventuels effets toxiques.

Sa précocité et son inductibilité en présence de pollution permettent de le classer parmi les **biomarqueurs d'exposition**. La mesure de l'activité MDMX permet en effet de mettre en évidence une activation anormale du système de défense, et ainsi de détecter une situation stressante, et ce, avant que cette situation n'ait un impact marqué sur les organismes. Selon la terminologie proposée par de Lafontaine *et al.* (2000), le biomarqueur MDMX pourrait légitimement être classé parmi les **biomarqueurs de défense**.

Sa réponse non spécifique permet de le classer parmi les biomarqueurs de stress global. Elle reflète ainsi l'exposition réelle des organismes à un cumul de stress, parmi lesquels figurent les stress polluants. En ce sens, la prise en compte du MDMX dans l'évaluation du

risque environnemental offre une approche globale plus réaliste, intégrant les interactions entre organismes, milieu et polluants (Smital et Kurelec, 1998a).

### Quelle place pour le MDMX parmi les outils de surveillance des écosystèmes déjà disponibles ?

L'activation de la défense MDMX étant susceptible de mettre en évidence la survenue d'un stress lié à l'apparition ou à l'augmentation d'une charge polluante, il devient envisageable d'utiliser le suivi de l'activité MDMX mesurée par la méthode d'efflux chez *Dreissena polymorpha* afin de réaliser une surveillance globale des milieux aquatiques dulçaquicoles.

De plus, la possibilité d'utiliser en parallèle la même méthode pour l'évaluation de la présence des composés chimiosensibilisants permet d'envisager de compléter et confirmer les résultats obtenus pour l'activité MDMX, en mettant en évidence l'aptitude du milieu à favoriser la toxicité de polluants par inhibition de ce système de défense.

L'utilisation de la réponse du MDMX peut permettre un constat et une prise de conscience précoce de l'éventualité de la dégradation d'un milieu et des moyens à mettre en œuvre pour améliorer la situation ou tout au moins éviter qu'elle ne se dégrade encore plus. La mise en évidence d'un stress en utilisant ce biomarqueur ne permettant pas de déterminer la nature et l'ampleur du stress subi par les organismes, l'étude de la réponse d'autres biomarqueurs et la réalisation des dosages physico-chimiques viendront compléter et confirmer le diagnostic en apportant des précisions concernant les sources potentielles de ce stress et les effets prévisibles.

## Chapitre 5.2 : Perspectives

Cette étude réalisée chez *Dreissena polymorpha* a dégagé les potentialités du système MDMX à répondre aux principales exigences requises pour son utilisation en tant que biomarqueur d'exposition. L'approche mise en œuvre consistant à se focaliser sur la réalisation d'expérimentations *in situ* tout en développant des études en laboratoire a permis d'émettre des hypothèses pour l'interprétation des réactions de l'activité MDMX évaluée par la méthode d'efflux chez la dreissène (Figure 59). Les perspectives de ce travail peuvent se résumer à préciser le schéma d'interprétation ainsi dégagé.

### I - Etudes à long terme sur des dreissènes autochtones

#### A – Caractériser le site de référence et la population de dreissènes étudiée

La connaissance des caractéristiques de l'activité MDMX dans la population de dreissène utilisée comme population de référence apparaît comme un élément primordial. La synthèse des résultats que nous avons obtenus suite à l'étude des dreissènes originaires de La Maxe a permis d'initier ce travail. A partir des bases ainsi établies, il est maintenant envisageable d'effectuer un suivi plus poussé des variations naturelles de l'activité chez ces dreissènes autochtones. En parallèle, le suivi pourra être réalisé chez des dreissènes encagées sur leur propre site afin de déterminer l'impact de l'encagement sur les réponses obtenues. Ce travail devra être accompagné de relevés précis des caractéristiques physico-chimiques et des teneurs en micropolluants. L'obtention de ces données pourrait permettre d'utiliser ce site comme un site de référence (Lagadic *et al.*, 1997b), en terme de connaissance de la réaction du système MDMX dans cette population bien établie en relation avec les caractéristiques physico-chimiques du milieu.

#### B – Caractériser un site pollué et sa population de dreissènes autochtones

Etudier en parallèle le comportement de l'activité évalué chez des dreissènes vivant sur un site pollué permettrait de comparer les éléments caractéristiques de cette activité avec celles obtenues sur le site de référence.

Le travail envisagé précédemment ne pourra se faire sans intégrer le MDMX au sein de la physiologie globale de l'organisme. En effet, la compréhension des variations naturelles de l'activité dues à des processus physiologiques (cycle reproducteur) ou à des facteurs extérieurs (température, disponibilité en nourriture, charge organique, débit) permettront de mieux distinguer l'effet d'un stress anthropique. L'approche mise en œuvre au cours du suivi saisonnier réalisé pendant cette thèse pourrait être renouvelée en étudiant l'évolution de la réaction mesurée sur un site dégradé en relation avec l'évaluation des teneurs en micropolluants et des descripteurs de l'état physiologique des organismes (indice gonadique, indice de condition). Cette approche pourra être complétée par des travaux en laboratoire visant à étudier en parallèle l'influence des paramètres isolés sur la réponse et de la comparer avec le résultat obtenu *in situ*.

## II - Etudes à court terme sur des dreissènes engagées

L'objectif de ce type d'approche consiste à mieux comprendre les paramètres de la réaction du système MDMX *in situ* afin de compléter le schéma d'interprétation présenté sur la figure 59. Les perspectives de travail à ce sujet s'orientent vers la précision des seuils permettant de distinguer les niveaux d'activité MDMX caractéristiques d'une situation de référence de ceux caractérisant une situation de stress. Ensuite, il faudrait déterminer les niveaux d'induction maximum et les seuils faisant basculer l'organisme d'une situation de défense à une situation d'apparition d'effets délétères. Dans cette optique, l'étude du potentiel inhibiteur des eaux s'est avéré informatif et l'utilisation de ce paramètre pourra compléter les données.

En parallèle, il est envisagé de comparer la réponse de dreissènes engagées *in situ* à celle de dreissènes autochtones des sites étudiés. En effet, nous avons travaillé jusqu'à présent en évaluant une induction par comparaison à un niveau basal dit théorique, mesuré après dépuration en laboratoire. Il serait cependant intéressant d'évaluer cette induction par rapport au niveau d'activité présenté par les dreissènes autochtones, afin de déterminer si le niveau d'induction peut dépasser le niveau basal de terrain présenté par ces dreissènes constamment soumises aux conditions des sites étudiés.

Les résultats obtenus au cours de ces travaux ont montré que le MDMX réagissait face à un cumul de stress. Afin de compléter cette information, il pourrait être envisagé de déterminer les groupes de paramètres physico-chimiques les plus représentatifs d'un milieu engendrant la réaction du MDMX *in situ*. Dans cette optique, la réalisation d'expérimentations en laboratoire permettra d'isoler les différents paramètres à tester afin de mettre en évidence la pertinence de leur choix.

### III – Mise en évidence de Pgps-like

A notre connaissance, un seul travail recense la mise en évidence en Western blot d'une Pgp-like chez la dreissène (Jaouen *et al.*, 2000). En utilisant le même anticorps, C219, nous n'avons pas pu détecter de Pgps-like chez des dreissènes prélevées à La Maxe, qui présentent pourtant une activité MDMX mesurable (Résultats non présentés). De la même manière, l'utilisation d'un autre anticorps (Anti-C) s'est également révélée inefficace chez ce bivalve, alors que des niveaux d'activité ont pu être mesurés par deux méthodes d'évaluation directe (Smital *et al.*, 2000b). L'utilisation du Western blot est une méthode assez courante et relativement simple à mettre en œuvre, qui a permis la détection de Pgps-like chez de nombreux invertébrés aquatiques (Chapitre 1, § III-B-1, Tableau IV). Des travaux ont cependant souligné que son efficacité n'est pas systématique du fait de la détection de faux positifs. De plus, cette technique s'est montrée inefficace pour détecter des différences de titre protéique pour une variation d'activité de 20% (Kurelec *et al.*, 2000). Etant donné que la détection de Pgps-like n'était pas l'axe central du travail de thèse, nous n'avons pas persévéré dans cette recherche au cours de la thèse. Naturellement, de nouveaux travaux pourront être mis en place par la suite afin de se consacrer plus particulièrement à cet aspect du sujet.

***En conclusion, la poursuite de l'étude du système MDMX chez la dreissène selon l'approche que nous avons mise en place et selon les perspectives qui ont été dégagées, laisse entrevoir la possibilité de valider son utilisation en tant que biomarqueur afin qu'il puisse, à terme, être intégré parmi les outils de la surveillance environnementale.***

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## A

- Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H. S., Jain, S. K., Athar, M. et Raisuddin, S. (2000) - Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure - *Biochim. Biophys. Acta*, **1519**: 37-48.
- Albertus, J. A. et Laine, R. O. (2001) - Enhanced xenobiotic transporter expression in normal teleost hepatocytes : response to environmental and chemotherapeutic toxins - *J. Exp. Biol.*, **204**: 217-227.
- Allinger, N. L., Cava, M. P., Johnson, C. R., De Jong, D. C., LeBel, N. A. et Stevens, C. L. (1992) - Chimie organique - Volume 3 : applications - Mc Graw Hill, Paris, pp. 838.
- Alsenz, J., Steffen, H. et Alex, R. (1998) - Active apical secretory efflux of the HIV protease inhibitors saquinavir and ritonavir in Caco-2 cell monolayers - *Pharmacol. Res.*, **15**: 423-428.
- Altenberg, G. A., Vanoye, C. G., Horton, J. K. et Reuss, L. (1994) - Unidirectional fluxes of rhodamine 123 in multidrug-resistant cells : evidence against direct drug extrusion from the plasma membrane - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 4654-4657.
- Ambudkar, S. V., Cardarelli, C. O., Pashinsky, I. et Stein, W. D. (1997) - Relation between the turnover number for vinblastine transport and for vinblastine-stimulated ATP hydrolysis by human P-glycoprotein - *J. Biol. Chem.*, **272**: 21160-21166.
- Ambudkar, S. V., Dey, S., Hrycyna, C. A., Ramachandra, M., Pastan, I. et Gottesman, M. M. (1999) - Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter - *Annu. Rev. Pharmacol.*, **39**: 361-398.
- Antonelli, G., Turriziani, O., Cianfriglia, M., Riva, E., Dong, G., Fattarossi, A. et Dianzani, F. (1992) - Resistance of HIV-1 to AZT might also involve the cellular expression of multidrug resistance P-glycoprotein - *Aids Res. Hum. Retrovir.*, **8**: 1839-1844.
- Aungst, B. J. (1999) - P-glycoprotein, secretory transport, and other barriers to the oral delivery of anti-HIV drugs - *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **39**: 105-116.
- Ayesh, S., Shao, Y. M. et Stein, W. D. (1996) - Co-operative, competitive and non-competitive interactions between modulators of P-glycoprotein - *Biochim. Biophys. Acta*, **1316**: 8-18.

## B

- Bachmann, V., Usseglio - Polatera, P., Cegiekla, E., Wagner, P., Poinssaint, J. F. et Moreteau, J. C. (1997) - Premières observations sur la coexistence de *Dreissena polymorpha*, *Corophium curvispinum* et *Corbicula spp.* dans la rivière Moselle. - *B. Fr. Pêche Piscic.*, **344/345**: 373-384.
- Bachmann, V., 2000. Dynamique spatio-temporelle d'espèces invasives, particulièrement *Corbicula spp.* et *Dreissena polymorpha* (Mollusca : Bivalvia) en hydrosystème fluvial : évolution des populations et effets de l'artificialisation sur les peuplements macrobenthiques. Thèse de Doctorat, Université de Metz, pp. 229p.
- Bachmann, V., Beisel, J. N., Usseglio-Polatera, P. et Moreteau, J. C. (2001) - Decline of *Dreissena polymorpha* in the River Moselle: biotic and abiotic key factors involved in dynamics of invasive species. - *Arch. Hydrobiol.*, **151**: 263-281.
- Baguley, B. C. (2002) - Novel strategies for overcoming multidrug resistance in cancer - *Biodrugs*, **16**: 97-103.
- Bähr, O., Wick, W. et Weller, M. (2001) - Modulation of MDR/MRP by wild-type and mutant p53 - *J. Clin. Invest.*, **107**: 643-645.
- Bain, L. J. et Leblanc, G. A. (1996) - Interaction of Structurally Diverse Pesticides with the Human MDR1 Gene Product P-Glycoprotein - *Toxicol. Appl. Pharm.*, **141**: 288-298.
- Bain, L. J., Mclachlan, J. B. et Leblanc, G. A. (1997) - Structure-activity relationships for xenobiotic transport substrates and inhibitory ligands of P-glycoprotein - *Environ. Health Persp.*, **105**: 812-818.
- Balzi, E., Wang, M., Leterme, S., van Dijk, L. et Goffeau, A. (1994) - Pdr5, a novel yeast multidrug resistance conferring transporter controlled by the transcription regulator Pdr1 - *J. Biol. Chem.*, **269**: 2206-2214.
- Bard, S. M. (2000) - Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms - *Aquat. Toxicol.*, **48**: 357-389.
- Bard, S. M., Woodin, B. R. et Stegeman, J. J. (2002a) - Expression of P-glycoprotein and cytochrome P450 1A in intertidal fish (*Anoplarchus purpureus*) exposed to environmental contaminants - *Aquat. Toxicol.*, **60**: 17-32.
- Bard, S. M., Bello, S. M., Hahn, M. E. et Stegeman, J. J. (2002b) - Expression of P-glycoprotein in killifish (*Fundulus heteroclitus*) exposed to environmental xenobiotics - *Aquat. Toxicol.*, **59**: 237-251.

- Barnouin, K., Leier, I., Jedlitschky, G., Pourtier-Manzanedo, A., König, J., Lehman, W. D. et Keppler, D. (1998) - Multidrug resistance protein-mediated transport of chlorambucil and melphalan conjugated to glutathione - *Br. J. Cancer*, **77**: 201-209.
- Baudard, M., Pastan, I. et Gottesman, M. M. (1996) - Transfer of the MDR1 Gene into Haematopoietic Cells - *Eur. J. Cancer*, **32**: 1019-1023.
- Beck, W. T., Grogan, T. M., Willman, C. M., Cordon-Cardo, C., Parham, D. M., Kuttesch, J. F., Andreeff, M., Bates, S. E., Berard, C. W., Boyett, J. M., Brophy, N. A., Broxterman, H. J., Chan, H. S. L., Dalton, W. S., Dietel, M., Fojo, A. T., Gascoyne, R. D., Head, D., Houghton, P. J., Kumar Srivastava, D., Lehnert, M., Leith, C. P., Paietta, E., Pavelic, Z. P., Rimsza, L., Roninson, I. B., Sikic, B. I., Twentyman, P. R., Warnke, R. et Weinstein, R. (1996) - Methods to detect P-glycoprotein-associated multidrug resistance in patients' tumors: consensus recommendations - *Cancer Res.*, **56**: 3010-3020.
- Benderra, Z., Trussardi, A., Morjani, H., Villa, A. M., Doglia, S. M. et Manfait, M. (2000) - Regulation of cellular glutathione modulates nuclear accumulation of daunorubicin in human MCF7 cells overexpressing multidrug resistance associated protein - *Eur. J. Cancer*, **36**: 428-434.
- Benet, L. Z., Izumi, T., Zhang, Y., Silverman, J. A. et Wachter, V. J. (1999) - Intestinal MDR transport proteins and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery - *J. Control. Release*, **62**: 25-31.
- Biedler, J. L. et Riehm, H. (1970) - Cellular resistance to actinomycin D in chinese hamster cells in vitro : cross resistance, radioautographic, and cytogenetic studies - *Cancer Res.*, **30**: 1174-1184.
- Boer, R., Dichtl, M., Borchers, C., Ulrich, W. R., Marecek, J. F., Prestwich, G. D., Glossmann, H. et Striessnig, J. (1996) - Reversible labeling of a chemosensitizer binding domain of P-glycoprotein with a novel 1,4-dihydropyridine drug transport inhibitor - *Biochemistry*, **35**: 1387-1396.
- Bonfanti, P., Colombo, A. et Camatini, M. (1998) - Identification of a multixenobiotic resistance mechanism in *Xenopus laevis* embryos - *Chemosphere*, **37**: 2751-2760.
- Bonser, G. M., Clayson, D. B. et Jull, J. W. (1956) - The induction of tumors of the subcutaneous tissues, liver and intestine in the mouse by certain dye-stuffs and their intermediates - *Brit. J. Cancer*, **10**: 653-667.
- Borcherding, J. (1991) - The annual reproductive cycle of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* Pallas in lakes - *Oecologia*, **87**: 208-218.
- Borcherding, J. (1992) - Morphometric changes in relation to the annual reproductive cycle in *Dreissena polymorpha* - a prerequisite for biomonitoring studies with zebra mussels. - In: Neumann, D. & Jenner, H. A. (eds.): *The zebra mussel Dreissena polymorpha* - Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Limnologie Aktuell. Vol.4, pp. 87-99.
- Borg, A. G., Burgess, R., Green, L. M., Scheper, R. J. et Yin, J. A. L. (1998) - Overexpression of lung-resistance protein and increased P-glycoprotein function in acute myeloid leukaemia cells predict a poor response to chemotherapy and reduced patient survival - *Brit. J. Haematol.*, **103**: 1083-1091.
- Borst, P. et Schinkel, A. H. (1996) - What have we learnt thus far from mice with disrupted P-glycoprotein genes? - *Eur. J. Cancer*, **32A**: 985-990.
- Borst, P. et Schinkel, A. (1997) - Genetic dissection of the function of mammalian P-glycoproteins - *Trends Genet.*, **13**: 217-222.
- Borst, P., Kool, M. et Evers, R. (1997) - Do cMOAT (MRP2), other MRP homologues, and LRP play a role in MDR? - *Semin. Cancer Biol.*, **8**: 205-213.
- Borst, P., Zelcer, N. et van Helvoort, A. (2000a) - ABC Transporters in lipid transport - *Biochim. Biophys. Acta*, **1486**: 128-144.
- Borst, P., Evers, R., Kool, M. et Wijnholds, J. (2000b) - A family of drug transporters: The multidrug resistance-associated proteins - *J. Natl. Cancer I.*, **92**: 1295-1302.
- Borst, P. et Oude Elferink, R. (2002) - Mammalian ABC transporters in health and disease - *Annu. Rev. Biochem.*, **71**: 537-592.
- Bosch, I. et Croop, J. M. (1996) - P-glycoprotein multidrug resistance and cancer - *Biochim. Biophys. Acta*, **1288**: F37-F54.
- Bosch, I., Dunussi-Joannopoulos, K., Wu, R. L., Furlong, S. et Croop, J. (1997) - Phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine behave as substrates of the human MDR1 P-glycoprotein - *Biochemistry*, **36**: 5685-5694.
- Bosch, I. et Croop, J. M. (1998) - P-glycoprotein structure and evolutionary homologies - *Cytotechnology*, **27**: 1-30.
- Boscoboinik, D., Debanne, M. T., Staford, A. R., Jung, C. Y., Gupta, R. S. et Epan, R. M. (1990) - Dimerization of the P-glycoprotein in membranes - *Biochim. Biophys. Acta*, **1027**: 225-228.
- Bouffard, D. Y., Ohkawa, T., Kijima, H., Irie, A., Suzuki, T., Curcio, L. D., Holm, P. S., Sassani, A. et Scanlon, K. J. (1996) - Oligonucleotide Modulation of Multidrug Resistance - *Eur. J. Cancer*, **32**: 1010-1018.



- Bradley, G., Georges, E. et Ling, V. (1990) - Sex-dependent and independent expression of the P-glycoprotein isoforms in chinese hamster - *J. Cell. Physiol.*, **145**: 398-408.
- Bradshaw, D. M. et Arceci, R. J. (1998) - Clinical relevance of transmembrane drug efflux as a mechanism of multidrug resistance - *J. Clin. Oncol.*, **16**: 3674-3690.
- Bresler, V., Bissinger, V., Abelson, A., Dizer, H., Sturm, A., Kratke, R., Fishelson, L. et Hansen, P. D. (1999) - Marine molluscs and fish as biomarkers of pollution stress in littoral regions of the Red Sea, Mediterranean Sea and North Sea - *Helgoland Mar. Res.*, **53**: 219-243.
- Britvic, S. et Kurelec, B. (1999) - The effects of inhibitors of multixenobiotic resistance mechanism on the production of mutagens by *Dreissena polymorpha* in water spiked with premutagens - *Aquat. Toxicol.*, **47**: 107-116.
- Broeks, A., Janssen, H. W. R. M., Calafat, J. et Plasterk, R. H. A. (1995) - A P-glycoprotein protects *Caenorhabditis elegans* against natural toxins - *E.M.B.O.J.*, **14**: 1858-1866.
- Brown, J. P., Dietrich, P. S. et Bakner, C. M. (1979) - Mutagenicity testing of some drug and cosmetic dye lakes with the Salmonella/mammalian microsome assay - *Mutat. Res.*, **66**: 181-185.
- Bruggemann, E. P., Germann, U. A., Gottesman, M. M. et Pastan, I. (1989) - Two different regions of P-glycoprotein are photoaffinity-labeled by azidopine - *J. Biol. Chem.*, **264**: 15483-15488.
- Burgeot, T., Minier, C., Bocquené, G., Vincent, F., Cachot, J., Loizeau, V., Jaouen, A., Miramand, P., Guyot, T., Lesueur, P., Rochard, E. et Boet, P. (1999) - Programme Scientifique Seine-Aval - Des organismes sous stress, Ifremer, pp. 36.

## C

- Carlton, J. T. (1993) - Dispersal mechanisms of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). - In: Nalepa, T. F. & Schloesser, D. W. (eds.): *Zebra Mussels: biology, impacts and control* - Lewis Publishers, Boca Raton, USA, pp. 677-697.
- Center, M. S. (1985) - Mechanisms regulating drug resistance to adriamycin : evidence that drug accumulation in resistant cells is modulated by phosphorylation of a plasma membrane glycoprotein - *Biochem. Pharmacol.*, **34**: 1471-1476.
- Chambers, T. C., Chalikonda, I. et Eilon, G. (1990) - Correlation of protein kinase C translocation, P-glycoprotein phosphorylation and reduced drug accumulation in multidrug resistant human KB cells - *Biochem. Biophys. Res. Co.*, **169**: 253-259.
- Chan, H., S. L., Grogan, T. M., DeBoer, G., Haddad, G., Gallie, B. L. et Ling, V. (1996) - Diagnosis and Reversal of Multidrug Resistance in Paediatric Cancers - *Eur. J. Cancer*, **32**: 1051-1061.
- Chan, K. M., Davies, P. L., Childs, S., Veinot, L. et Ling, V. (1992) - P-glycoprotein genes in the winter flounder *Pleuronectes americanus* : isolation of two types of genomic clones carrying 3' terminal exons - *Biochim. Biophys. Acta*, **1171**: 65-72.
- Chen, C. M., Liu, M. C., Shih, M. L., Yu, S. C., Yeh, C. C., Lee, S. T., Yang, T. Y. et Hung, S. J. (2001) - Microsomal monooxygenase activity in Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) exposed to a bleached kraft mill effluent using different exposure systems - *Chemosphere*, **45**: 581-588.
- Cheng, S. H., Lam, W., Lee, A. S. K., Fung, K. P., Wu, R. S. S. et Fong, W. F. (2000) - Low level doxorubicin resistance in benzo[a]pyrene-treated KB-3-1 cells is associated with increased LRP expression and altered subcellular drug distribution - *Toxicol. Appl. Pharm.*, **164**: 134-142.
- Childs, S., Yeh, R. L., Georges, E. et Ling, V. (1995) - Identification of a sister gene to P-glycoprotein - *Cancer Res.*, **55**: 2029-2034.
- Chin, K. W., Ueda, K., Pastan, I. et Gottesman, M. M. (1992) - Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by ras and p53 - *Science*, **255**: 459-462.
- Chugani, D. C., Rome, L. H. et Kedersha, N. L. (1993) - Evidence that vault ribonucleoprotein particles localize to the nuclear pore complex - *J. Cell. Sci.*, **106**: 23-29.
- Claudi, R. et Mackie, G. L. (1994) - Practical manual for zebra mussel monitoring and control -, Boca Raton, pp. 227.
- Cole, S. P. C., Bhardwaj, G., Gerlach, J. H., Mackie, J. E., Grant, C. E., Almquist, K. C., Stewart, A. J., Kurz, E. U., Duncan, A. M. V. et Deeley, R. G. (1992) - Overexpression of a transporter gene in multidrug-resistant human lung cancer cell line - *Science*, **258**: 1650-1654.
- Cole, S. P. C., Sparks, K. E., Fraser, K., Loe, D. W., Grant, C. E. et Wilson, G. M. (1994) - Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells - *Cancer Res.*, **54**: 5902-5910.
- Conseil, G., Perez-Victoria, J. M., Jault, J. M., Gamarro, F., Goffeau, A., Hoffmann, J. et Di Pietro, A. (2001) - Protein kinase C effectors bind to multidrug ABC transporters and inhibit their activity - *Biochemistry*, **40**: 2564-2571.

- Cooper, P. S. (1999) - Altered expression of the xenobiotic transporter P-glycoprotein in liver and liver tumors of mummichog *Fundulus heteroclitus* from a creosote contaminated environment - *Biomarkers*, **4**: 48-58.
- Cooper, P. S., Reece, K. S., Vogelbein, W. K. et Van Veld, P. A. (2000) - P-glycoprotein and sister P-glycoprotein sequences from mummichog, *Fundulus heteroclitus*, liver and intestine - *Mar. Environ. Res.*, **500**: 331-335.
- Cornwall, R., Holland Toomey, B., Bard, B., Bacon, C., Jarman, W. M. et Epel, D. (1995) - Characterization of multixenobiotic/multidrug transport in the gills of the mussel *Mytilus californianus* and identification of environmental substrates - *Aquat. Toxicol.*, **31**: 277-296.
- Cornwell, M. M., Gottesman, M. M. et Pastan, I. H. (1986) - Increased vinblastine binding to membrane vesicles from multidrug resistant KB cells - *J. Biol. Chem.*, **261**: 7921-7928.
- Cornwell, M. M., Tsuruo, T., Gottesman, M. M. et Pastan, I. (1987) - ATP-binding properties of P-glycoprotein from multidrug resistant KB cells - *FASEB J.*, **1**: 51-54.
- Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M. C., Babut, M., Exinger, A. et Vasseur, P. (1997) - Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies - *Ecotox. Environ. Safe.*, **38**: 122-131.

## D

- Dano, K. (1973) - Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells - *Biochem. Biophys. Acta.*, **323**: 466-483.
- Davies, T. G. E., Theodoulou, F., Hallahan, D. et Forde, B. (1997) - Cloning and characterization of a novel P-glycoprotein homologue from barley - *Gene*, **199**: 195-202.
- de Lafontaine, Y., Gagne, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P. et Chan, H. M. (2000) - Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada) - *Aquat. Toxicol.*, **50**: 51-71.
- de Waard, M. A. (1997) - Significance of ABC transporters in fungicide sensitivity and resistance - *Pestic. Sci.*, **51**: 271-275.
- Del Sorbo, G., Andrade, A. C., Van Nistelrooy, J., Van Kan, J., Balzi, E. et De Waard, M. (1997) - Multidrug resistance in *Aspergillus nidulans* novel ATP-binding cassette transporters - *Mol. Gen. Genet.*, **254**: 417-426.
- Deplege, M. H. et Lundebye, A. K. (1996) - Physiological monitoring of contaminants effects in individual rock crabs, *Hemigrapsus edwardsi*: the ecotoxicological significance of variability in response. - *Comp. Biochem. Physiol.*, **113C**: 277-282.
- Descoteaux, S., Ayala, P., Orozco, E. et Samuelson, J. (1992) - Primary sequence of two P-glycoprotein genes of *Entamoeba histolytica* - *Mol. Biochem. Parasit.*, **54**: 201-211.
- Descoteaux, S., Ayala, P., Samuelson, J. et Orozco, E. (1995) - Increase in mRNA of multiple Ehp-gp genes encoding P-glycoprotein homologues in emetine-resistant *Entamoeba histolytica* parasites - *Gene*, **164**: 179-184.
- Desoize, B. et Jardillier, J.-C. (2000) - Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? - *Crit. Rev. Oncol. Hemat.*, **36**: 193-207.
- Dhainaut-Courtois, N., Romont, R., Ruffin, P. and Dhainaut, A. (1997) - Biomarqueurs moléculaires et cellulaires chez une Annélide Polychète estuarienne : *Nereis (Hediste) diversicolor* O.F. Müller. - In: Lagadic, L., Caquet, T., Amiard J.C., & Ramade F. (Eds.): *Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux* - Masson, Paris, pp. 115-123.
- Dhur, G. et Massard, J. A. (1995) - Etude historique et faunistique des Invertébrés immigrés ou introduits dans la Moselle luxembourgeoise et ses affluents - *Bull. Soc. Nat. luxemb.*, **96**: 127-156.
- Doi, A. M., Holmes, E. et Kleinow, K. M. (2001) - P-glycoprotein in the catfish intestine: inducibility by xenobiotics and functional properties - *Aquat. Toxicol.*, **55**: 157-170.
- Dolédec, S. et Chessel, D. (1987) - Rythmes saisonniers et composantes stationnelles en milieu aquatique. I. Description d'un plan d'observation complet par projection de variables - *Acta Oecologia, Oecol. Gener.*, **8**: 403-426.
- Doyle, L. A., Yang, W., Abruzzo, L. V., Krogman, T., Gao, Y., Rishi, A. K. et Ross, D. D. (1998) - A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 15665-15670.
- Doyotte, A., Cossu, C., Jacquin, M. C., Babut, M. et Vasseur, P. (1997) - Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus* - *Aquat. Toxicol.*, **39**: 93-110.

Dudler, R. et Hertig, C. (1992) - Structure of an mdr-like gene from *Arabidopsis thaliana* - *J. Biol. Chem.*, **267**: 5882-5888.

## E

- EBSE-PEE et EDF-DER (1999) - Essais de biomarqueurs chez *Dreissena polymorpha* dans la Meuse aux abords de la centrale électronucléaire de Chooz B, Université de Metz - UFR - Sci FA.
- EBSE-PEE et EDF-CNP (2002) - Etude et suivi hydrobiologique du site et du centre nucléaire de production d'électricité de Cattenom, Université de Metz - UFR-Sci-FA, pp. 87.
- Edelmann, H. M. L., Duchek, P., Rosenthal, F. E., Föger, N., Glackin, C., Kane, S. E. et Kuchler, K. (1999) - Cmdr1, a chicken P-glycoprotein, confers multidrug resistance and interacts with estradiol - *Biol. Chem.*, **380**: 231-241.
- Elliott, G. S., Mason, R. W. et Edwards, I. R. (1990) - Studies on the pharmacokinetics and mutagenic potential of rhodamine B - *Clin. Toxicol.*, **28**: 45-59.
- Endicott, J. A. et Ling, V. (1989) - The Biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance - *Annu. Rev. Biochem.*, **58**: 137-171.
- Epel, D. (1998) - Use of multidrug transporters as a first line defense against toxins in aquatic organisms - *Comp. Biochem. Phys. A*, **120**: 23-28.
- Epel, D. et Eufemia, N. A. (1998) - The multidrug/multixenobiotic transporter defense mechanism : induction and energy costs - *Mar. Environ. Res.*, **46**: 457-458.
- Eufemia, N. A. et Epel, D. (1998) - The multixenobiotic defense mechanism in mussels is induced by substrates and non-substrates : implications for a general stress response - *Mar. Environ. Res.*, **46**: 401-405.
- Eufemia, N. A. et Epel, D. (2000) - Induction of the multixenobiotic defense mechanism (MXR), P-glycoprotein in the mussel *Mytilus californianus* as a general cellular response to environmental stress - *Aquat. Toxicol.*, **49**: 89-100.
- Eufemia, N. A., Clerte, S., Girshick, S. et Epel, D. (2002) - Algal products as naturally occurring substrates for P-glycoprotein in *Mytilus californianus* - *Mar. Biol.*, **140**: 343-353.
- Eytan, G. D., Regev, R. et Assaraf, Y. G. (1996) - Functional reconstitution of P-glycoprotein reveals an apparent near stoichiometric drug transport to ATP hydrolysis - *J. Biol. Chem.*, **271**: 3172-3178.
- Eytan, G. D., Regev, R., Oren, G., Hurwitz, C. et Assaraf, G. (1997) - Efficiency of P-glycoprotein-mediated exclusion of rhodamine dyes from multidrug-resistant cells is determined by their passive transmembrane movement rate - *Eur. J. Biochem.*, **248**: 104-112.
- Eytan, G. D. et Kuchel, P. W. (1999) - Mechanism of action of P-glycoprotein in relation to passive membrane permeation - *Int. Rev. Cytol.*, **190**: 175-250.

## F

- Fanslow, D. L., Nalepa, T. F. et Lang, G. A. (1995) - Filtration rates of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) on natural seston from Saginaw Bay, Lake Huron - *J. Great Lakes Res.*, **21**: 489-500.
- Fardel, O., Loyer, P., Lecœur, V., Glaize, D. et Guillouzo, A. (1994) - Constitutive expression of functional P-glycoprotein in rat hepatoma cells - *Eur. J. Biochem.*, **219**: 521-528.
- Ferguson, L. R. et Baguley, B. C. (1993) - Multidrug resistance and mutagenesis - *Mutat. Res.*, **285**: 79-90.
- Field, M. S., Wilhelm, R. G., Quinlan, J. F. et Aley, T. J. (1995) - An assessment of the potential adverse properties of fluorescent tracer dyes used for groundwater tracing - *Environ. Monit. Assess.*, **38**: 75-96.
- Fine, R. L., Patel, J. et Chabner, B. A. (1988) - Phorbol esters induce multidrug resistance in human breast cancer cells - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 582-586.
- Fisher, G. A., Lum, B. L., Hausdorff, J. et Sikic, B. I. (1996) - Pharmacological Considerations in the Modulation of Multidrug Resistance - *Eur. J. Cancer*, **32**: 1082-1088.
- Fisher, P. (1999) - Review of using Rhodamine B as a marker for wildlife studies - *Wildlife Soc. B.*, **27**: 318-329.
- Foote, F. J., Thompson, J. K., Cowman, A. F. et Kemp, D. J. (1989) - Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of *Plasmodium falciparum* - *Cell*, **57**: 921-930.
- Ford, J. M. et Hait, W. N. (1990) - Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer - *Pharmacol. Rev.*, **42**: 155-199.
- Ford, J. M. (1996) - Experimental Reversal of P-glycoprotein-mediated Multidrug Resistance by Pharmacological Chemosensitisers - *Eur. J. Cancer*, **32**: 991-1001.

- Fromm, M. F. (2000) - P-glycoprotein: a defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs - *Int. J. Clin. Pharm. Th.*, **38**: 69-74.
- Fukushima, Y., Oshika, Y., Tokunaga, T., Hatanaka, H., Tomisawa, M., Kawai, K., Ozeki, Y., Tsuchida, T., Kijima, H., Yamazaki, H., Ueyama, Y., Tamaoki, N., Miura, S. et Nakamura, M. (1999) - Multidrug resistance-associated protein (MRP) expression is correlated with expression of aberrant p53 protein in colorectal cancer - *Eur. J. Cancer*, **35**: 935-938.

## G

- Galgani, F., Cornwall, R., Toomey, B. et Epel, D. (1996) - Interaction of environmental xenobiotics with a multixenobiotic defense mechanism in the bay mussel *Mytilus Galloprovincialis* from the coast of California - *Environ. Toxicol. Chem.*, **15**: 325-331.
- Georges, E., Bradley, G., Gariepy, J. et Ling, V. (1990) - Detection of P-glycoprotein isoforms by gene-specific monoclonal antibodies - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 152-156.
- Gerloff, T., Stieger, B., Hagenbuch, B., Madon, J., Landmann, L., Roth, J., Hofmann, A. F. et Meier, P. J. (1998) - The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver - *J. Biol. Chem.*, **273**: 10046-10050.
- Germann, U. A., Chambers, T. C., Ambudkar, S. V., Pastan, I. et Gottesman, M. M. (1995) - Effects of phosphorylation of P-glycoprotein on multidrug resistance - *Eur. J. Cancer*, **32A**: 927-944.
- Germann, U. A., Chambers, T. C., Ambudkar, S. V., Licht, T., Cardarelli, C. O., Pastan, I. et Gottesman, M. M. (1996) - Characterization of phosphorylation-defective mutants of human P-glycoprotein expressed in mammalian cells - *J. Biol. Chem.*, **271**: 1708-1716.
- Germann, U. A. et Chambers, T. C. (1998) - Molecular analysis of the multidrug transporter, P-glycoprotein - *Cytotechnology*, **27**: 31-60.
- Giamberini, L., Guérol, F., Beauvais, M. N. et Pihan, J. C. (1996) - Histopathological effects of an organic molluscicide on the gills of the zebra mussel : ultrastructural study - *Toxicol. Environ. Chem.*, **57**: 27-35.
- Giamberini, L. et Pihan, J.-C. (1997) - Lysosomal changes in the hemocytes of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* experimentally exposed to lead and zinc - *Dis. Aquat. Organ.*, **28**: 221-227.
- Goldstein, L. J. (1996) - MDR1 Gene Expression in Solid Tumours - *Eur. J. Cancer*, **32**: 1039-1050.
- Gottesman, M. M. et Pastan, I. (1993) - Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter - *Annu. Rev. Biochem.*, **62**: 385-427.
- Grant, C. E., Valdimarsson, G., Hipfner, D. R., Almquist, K. C., Cole, S. P. C. et Deeley, R. G. (1994) - Overexpression of a multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs - *Cancer Res.*, **54**: 357-361.
- Greenberger, L. M., Lisanti, J., Silva, J. T. et Horwitz, S. B. (1991) - Domain mapping of the photoaffinity drug-binding sites in P-glycoprotein encoded by mouse *mdr1b* - *J. Biol. Chem.*, **266**: 20744-20751.
- Grimm, E. D., Terenzi, M. F., Goldman, G. H., Bainy, A. C. D. et Terenzi, H. (2000) - Identification of homologs of the mammalian P-glycoprotein in the mussel, *Perna perna* - *Mar. Environ. Res.*, **50**: 331-335.
- Guengerich, F. P. (1999) - Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism - *Annu. Rev. Pharmacol.*, **31**: 1-17.
- Gupta, K. P., Ward, N. E., Gravitt, K. R., Bergman, P. J. et O'Brian, C. A. (1996) - Partial reversal of multidrug resistance in human breast cancer cells by a N-myristoylated protein kinase C alpha pseudosubstrate peptide - *J. Biol. Chem.*, **271**: 2102-2111.
- Gupta, S., Patel, K., Singh, H. et Gollapudi, S. (1994) - Effect of calphostin C (PKC inhibitor) on daunorubicin resistance in P388/ADR and HL60/AR cells : reversal of drug-resistance possibly via P-glycoprotein - *Cancer Lett.*, **76**: 139-145.
- Gupta, V., Kohli, A., Krishnamurthy, S., Puri, N., Aalamgeer, S. A., Panwar, S. et Prasad, R. (1998) - Identification of polymorphic mutant alleles of CaMDR1, a major facilitator of *Candida albicans* which confers multidrug resistance, and its in vitro transcriptional activation - *Curr. Genet.*, **34**: 192-199.

## H

- Hafkemeyer, P., Dey, S., Ambudkar, S. V., Hrycyna, C. A., Pastan, I. et Gottesman, M. M. (1998) - Contribution to substrate specificity and transport of nonconserved residues in transmembrane domain 12 of human P-glycoprotein - *Biochemistry*, **37**: 16400-16409.

- Hafkemeyer, P., Licht, T., Pastan, I. et Gottesman, M. M. (2000) - Chemoprotection of hematopoietic cells by a mutant p-glycoprotein resistant to a potent chemosensitizer of multidrug-resistant cancers - *Hum. Gene Ther.*, **11**: 555-565.
- Hahn, S. M., Russo, A., Cook, J. A. et Mitchell, J. B. (1999) - A multidrug-resistant breast cancer cell line induced by weekly exposure to doxorubicin - *Int. J. Oncol.*, **14**: 273-279.
- Hamada, H., Hagiwara, K. I., Nakajima, T. et Tsuruo, T. (1987) - Phosphorylation of the Mr 170 000 to 180 000 membrane glycoprotein specific to multidrug-resistant tumor cells : effects of verapamil, trifluoperazine and phorbol esters - *Cancer Res.*, **47**: 2860-2865.
- Hamdoun, A. M., Griffin, F. J. et Cherr, G. N. (2002) - Tolerance to biodegraded crude oil in marine invertebrate embryos and larvae is associated with expression of a multixenobiotic resistance transporter - *Aquat. Toxicol.*, **61**: 127-140.
- Hayer, F., Wagner, P. et Pihan, J.-C. (1996) - Monitoring of extractable organic halogens (EOX) in chlorine bleached pulp and paper mill effluents using four species of transplanted aquatic mollusks - *Chemosphere*, **33**: 2321-2334.
- Hayer, F., 1997. Estimation de la contamination du milieu aquatique par les composés organohalogénés (AOX et EOX). Application à l'étude d'accumulation et de relargage des EOX par *Anodonta cygnea* L., exposé *in situ* aux effluents d'une usine de pâte à papier. Thèse de Doctorat, Université de Metz, pp. 220.
- Hebert, P. N. D., Muncaster, B. W. et Mackie, G. L. (1989) - Ecological and genetic studies on *Dreissena polymorpha* (Pallas) : a new mollusc in the Great Lakes - *Can. J. Fish. et Aquat. Sci.*, **46**: 1587-1591.
- Hedley, D. W., Xie, S. X., Minden, M. D., Choi, C. H., Chen, H. et Ling, V. (1997) - A novel energy dependent mechanism reducing daunorubicin accumulation in acute myeloid leukemia - *Leukemia*, **11**: 48-53.
- Hemmer, M. J., Courtney, L. A. et Ortego, L. S. (1995) - Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in teleost tissues using mammalian polyclonal and monoclonal antibodies - *J. Exp. Zool.*, **272**: 69-77.
- Hickman, J. A. (1996) - Apoptosis and Chemotherapy Resistance - *Eur. J. Cancer*, **32**: 921-926.
- Higgins, C. F. (1992) - ABC transporters: from microorganisms to man - *Annu. Rev. Cell. Biol.*, **8**: 67-113.
- Higgins, C. F. et Gottesman, M. M. (1992) - Is the multidrug transporteur a flippase ? - *Trends Pharmacol. Sci.*, **17**: 18-21.
- Hodson, P. V., Mc Whirter, M., Ralph, K., Gray, B., Thivierge, D., Carey, J. H., Van Der Kraak, G., Whittle, D. M. et Levesque, M. C. (1992) - Effects of bleached kraft mill effluent on fish in the St Maurice River, Quebec - *Environ. Toxicol. Chem.*, **11**: 1335-1651.
- Hoffman, H. J. (1986) - Untersuchung der AOX-Gehalte in bayrischen Flüssen. Bewertung der Gewässerqualität und Gewässergüteanforderungen - *Münchner Beiträge zur Abwasser, Fischerei und Flussbiologie*, **40**: 445-449.
- Hofsli, E. et Nissen-Meyer, J. (1990) - Reversal of multidrug resistance by lipophilic drugs - *Cancer Res.*, **50**: 3997-4002.
- Holland, I. B. et Blight, M. A. (1999) - ABC-ATPases, adaptable generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to human - *J. Mol. Biol.*, **293**: 381-399.
- Homolya, L., Hollo, Z., Germann, U. A., Pastan, I., Gottesman, M. M. et Sarkadi, B. (1993) - Fluorescent cellular indicators are extruded by the multidrug resistance protein - *J. Biol. Chem.*, **268**: 21493-21496.
- Horio, M., Gottesman, M. M. et Pastan, I. (1988) - ATP-dependent transport of vinblastine in vesicles from human multidrug-resistant cells - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 3580-3584.
- Hrycyna, C. A. et Gottesman, M. M. (1998) - Multidrug ABC transporters from bacteria to man: an emerging hypothesis for the universality of molecular mechanism and function - *Drug Resist. Update*, **1**: 81-83.
- Hrycyna, C. A., Ramachandra, M., Germann, U. A., Wu Cheng, P., Pastan, I. et Gottesman, M. M. (1999) - Both ATP sites of human P-glycoprotein are essential but not symmetric - *Biochemistry*, **38**: 13887-13899.
- Hyde, S. C., Emsley, P., Hartshorn, M. J., Mimmack, M. M., Gileadi, U., Pearce, S. R., Gallagher, M. P., Gill, D. R., Hubbard, R. E. et Higgins, C. F. (1990) - Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance, and bacterial transport - *Nature*, **346**: 362-365.

## I

- IARC (1978) - IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans - **16**.
- IARC (1987) - IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans - **Suppl 7**.

- Ichikawa, M., Yoshimura, A., Sumizawa, T., Shudo, N., Kuwazuru, Y., Furukawa, T. et Akiyama, S. (1991) - Interaction of organic chemicals with P-glycoprotein in the adrenal gland, kidney, and a multidrug resistant KB cells - *J. Biol. Chem.*, 903-908.
- Idriss, H. T., Hannun, Y. A., Boulpaep, E. et Basavappa, S. (2000) - Regulation of volume-activated chloride channels by P-glycoprotein: phosphorylation has the final say! - *J. Physiol.-London*, 524: 629-636.
- Inaba, M., Kobayashi, H., Sakurai, Y. et Jonhson, R. K. (1979) - Active efflux of daunorubicin and adriamycin in sensitive and resistant sublines of P388 leukemia - *Cancer Res.*, 39: 2200-2203.
- Ishikawa, T. (1992) - The ATP-dependant glutathione S-conjugate export pump - *Trends Biochem. Sci.*, 17: 463-468.
- Izquierdo, M. A., Scheffer, G. L., Flens, M. J., Schroeijsers, A. B., van der Valk, P. et Scheper, R. J. (1996) - Major Vault Protein LRP-related Multidrug Resistance - *Eur. J. Cancer*, 32: 979-984.

## J

- Jaouen, A., Galap, C., Minier, C., Tutundjian, R. et Leboulenger, F. (2000) - Bioaccumulation of pollutants and measures of biomarkers in the Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) from downstream river Seine - *B. Soc. Zool. Fr.*, 125: 239-249.
- Jedlitschky, G., Leier, I., Buchholz, U., Barnouin, K., Kurz, G. et Keppler, D. (1996) - Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump - *Cancer Res.*, 56: 988-994.
- Johnstone, R. W., Ruefli, A. A. et Smyth, M. J. (2000) - Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein ? - *Trends Biochem. Sci.*, 25: 1-6.
- Jones, P. et George, A. (1999) - Subunit interactions in ABC transposers : towards a functional architecture - *FEMS Microbiol. Lett.*, 179: 187-202.
- Jonker, J. W., Wagenaar, E., Vandeemter, L., Gottschlich, R., Bender, H. M., Dasenbrock, J. et Schinkel, A. H. (1999) - Role of blood-brain barrier P-glycoprotein in limiting brain accumulation and sedative side-effects of asimadoline, a peripherally acting analgaesic drug - *Brit. J. Pharmacol.*, 127: 43-50.
- Juliano, R. L. et Ling, V. (1976) - A surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants - *Biochim. Biophys. Acta*, 455: 152-162.

## K

- Kajiji, S., Talbot, F., Grizzuti, K., Van Dyke-Phillips, V., Agresti, M., Safa, A. R. et Gros, P. (1993) - Functional analysis of P-glycoprotein mutants identifies predicted transmembrane domain 11 as a putative drug binding site - *Biochemistry*, 32: 4185-4194.
- Kajikawa, T., Mishima, H. K., Murakami, T. et Takano, M. (1999) - Role of P-glycoprotein in distribution of rhodamine 123 into aqueous humor in rabbits - *Curr. Eye Res.*, 18: 240-246.
- Karnaky, K. J., Suggs, K., French, S. et Willingham, M. C. (1993) - Evidence for the multidrug transporter P-glycoprotein, in the killifish *Fundulus heteroclitus* - *Bull. Mount Desert Island Biol. Lab.*, 32: 61-62.
- Kartner, N., Everden-Porelle, D., Bradley, G. et Ling, V. (1985) - Detection of P-glycoprotein in multidrug resistant cell lines by monoclonal antibodies. - *Nature*, 316: 820-823.
- Keppler, C. J. et Ringwood, A. H. (2001a) - Expression of P-glycoprotein in southeastern oysters *Crassostrea virginica* - *Mar. Environ. Res.*, 52: 81-96.
- Keppler, C. J. et Ringwood, A. H. (2001b) - Expression of P-glycoprotein in the gills of oysters, *Crassostrea virginica*: seasonal and pollutant related effects - *Aquat. Toxicol.*, 54: 195-204.
- Kerr, K. M., Sauna, Z. E. et Ambudkar, S. V. (2001) - Correlation between steady-state ATP hydrolysis and vanadate-induced ADP trapping in human P-glycoprotein. Evidence for ADP release as the rate-limiting step in the catalytic cycle and its modulation by substrates - *J. Biol. Chem.*, 276: 8657-8664.
- Kessel, D., Botterill, V. et Wodinski, I. (1968) - Uptake and retention of daunomycin by mouse leukemic cells as factors in drug response - *Cancer Res.*, 28: 938-941.
- Khan, R. A. et Payne, J. F. (2002) - Some factors influencing EROD activity in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) exposed to effluent from a pulp and paper mill - *Chemosphere*, 46: 235-239.
- Kim, R. B., Fromm, M. F., Wandel, C., Leake, B., Wood, A. J. J., Roden, D. M. et Wilkinson, G. R. (1998) - The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors - *J. Clin. Invest.*, 101: 289-294.
- Kinzelbach, R. (1992) - The main features of the phylogeny and dispersal of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. - In: Neumann, D. & Jenner, H. A. (eds.): *The zebra mussel Dreissena polymorpha* - Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Limnologie Aktuell. Vol.4, pp. 5-17.

- Kitazono, M., Okumura, H. et Ikeda, R. (2001) - Reversal of LRP-associated drug resistance in colon carcinoma SW-620 cells - *Int. J. Cancer*, **91**: 126-131.
- Klein, I., Sarkadi, B. et Varadi, A. (1999) - An inventory of the human ABC proteins - *BBA-Biomembranes*, **1461**: 237-262.
- Kleinow, K. M., Doi, A. M. et Smith, A. A. (2000) - Distribution and inducibility of P-glycoprotein in the catfish: immunohistochemical detection using the mammalian C-219 monoclonal - *Mar. Environ. Res.*, **50**: 313-318.
- Köhler, A., Lauritzen, B., Bahns, S., George, S. G., Förlin, L. et Van Noorden, C. J. F. (1998a) - Clonal adaptation of cancer cells in flatfish liver to environmental contamination by changes in expression in Pgp related MXR, CYP450, GST-A and G6PDH activity - *Mar. Environ. Res.*, **46**: 191-195.
- Köhler, A., Lauritzen, B., Jansen, D., Böttcher, P., Teguliwa, L., Krüner, G. et Broeg, K. (1998b) - Detection of P-glycoprotein mediated MDR/MXR in *Carcinus maenas* hepatopancreas by immuno-gold-silver labeling - *Mar. Environ. Res.*, **46**: 411-414.
- Kovacs, T. G., Martel, P. H. et Voss, R. H. (2002) - Assessing the biological status of fish in a river receiving pulp and paper mill effluents - *Environ. Pollut.*, **118**: 123-140.
- Krishna, R. et Mayer, L. D. (2000) - Multidrug resistance (MDR) in cancer - Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs - *Eur. J. Pharm. Sci.*, **11**: 265-283.
- Kruh, G. D., Chan, A., Myers, K., Gaughan, K., Miki, T. et Aarinson, S. A. (1994) - Expression complementary DNA library transfer establishes *mnp* as a multidrug resistance gene - *Cancer Res.*, **54**: 1649-1652.
- Ktitorova, O. V., Kakpakova, E. S., Vinogradova, M. M., Il'ina, E. N., Govorun, V. M., Ivanov, P. K., Zabolina, T. N., Stavrovskaya, A. A. et Shtil, A. A. (2001) - Relation between the induction of MDR1, a multidrug resistance gene in tumor cells, and apoptosis - *Russian Journal of Developmental Biology*, **32**: 242-247.
- Kurelec, B. et Pivcevic, B. (1989) - Distinct glutathione-dependant enzyme activities and a verapamil-sensitive binding of xenobiotics in a fresh-water mussel *Anodonta cygnea* - *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **164**: 934-940.
- Kurelec, B. et Pivcevic, B. (1991) - Evidence for a multixenobiotic resistance mechanism in the mussel *Mytilus galloprovincialis* - *Aquat. Toxicol.*, **19**: 291-302.
- Kurelec, B. (1992) - The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms - *Crit. Rev. Toxicol.*, **22**: 23-43.
- Kurelec, B., Krca, S., Pivcevic, B., Ugarkovic, D., Bachmann, M., Imsiecke, G. et Müller, W. E. G. (1992) - Expression of P-glycoprotein gene in marine sponges. Identification and characterization of the 125 kDa drug-binding glycoprotein - *Carcinogenesis*, **13**: 69-76.
- Kurelec, B. (1995a) - Inhibition of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms: ecotoxic consequences - *Sci. Total Environ.*, **171**: 197-204.
- Kurelec, B. (1995b) - Reversion of the multixenobiotic resistance mechanism in gills of a marine mussel *Mytilus galloprovincialis* by a model inhibitor and environmental modulators of P170-glycoprotein - *Aquat. Toxicol.*, **33**: 93-103.
- Kurelec, B., Pivcevic, B. et Müller, W. E. G. (1995a) - Determination of pollutants with multixenobiotic resistance inhibiting properties - *Mar. Environ. Res.*, **39**: 261-265.
- Kurelec, B., Lucic, D., Pivcevic, B. et Krca, S. (1995b) - Induction and reversion of multixenobiotic resistance in the marine snail *Monodonta turbinata* - *Mar. Biol.*, **123**: 305-312.
- Kurelec, B., Krca, C. et Lucic, D. (1996a) - Expression of multixenobiotic resistance mechanism in a marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of exposure to polluted environments - *Comp. Biochem. Physiol. C*, **113**: 283-289.
- Kurelec, B., Waldmann, P. et Zahn, K. R. (1996b) - The modulation of protective effects of the multixenobiotic resistance mechanism in a clam *Corbicula fluminea* - *Mar. Environ. Res.*, **42**: 383-387.
- Kurelec, B. (1997) - A new type of hazardous chemical: the chemosensitizers of multixenobiotic resistance - *Environ. Health Persp.*, **105**: 855-860.
- Kurelec, B., Britvic, S., Pivcevic, B. et Smital, T. (1998) - Fragility of multixenobiotic resistance in aquatic organisms enhances the complexity of risk assessment - *Mar. Environ. Res.*, **46**: 415-419.
- Kurelec, B., Smital, T., Pivcevic, B., Eufemia, N. et Epel, D. (2000) - Multixenobiotic resistance, P-glycoprotein, and chemosensitizers - *Ecotoxicology*, **9**: 307-327.

## L

- Labialle, S., Gayet, L., Marthinet, E., Rigal, D. et Baggetto, L. G. (2002) - Transcriptional regulators of the human multidrug resistance 1 gene: recent views - *Biochem. Pharmacol.*, **64**: 943-948.
- Lagadic, L., Caquet, T. et Amiard, J. C. (1997a) - Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. - In: Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J. C., & Ramade, F. (eds.): *Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux* - Masson, Paris, pp. 1-9.
- Lagadic, L., Caquet, T. et Amiard, J. C. (1997b) - Intérêt d'une approche multiparamétrique pour le suivi de la qualité de l'environnement. - In: Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J. C., & Ramade, F. (eds.): *Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux* - Masson, Paris, pp. 393-401.
- Larsen, A. K. et Skladanowski, A. (1998) - Cellular resistance to topoisomerase-targeted drugs : from drug uptake to cell death - *Biochim. Biophys. Acta*, **1400**: 257-274.
- Larsen, A. K., Escargueil, A. E. et Skladanowski, A. (2000) - Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents - *Pharmacol. Therapeut.*, **85**: 217-229.
- Lecureur, V., Sun, D. X., Hargrove, P., Schuetz, E. G., Kim, R. B., Lan, L. B. et Schuetz, J. D. (2000) - Cloning and expression of murine sister of P-glycoprotein reveals a more discriminating transporter than MDR1/P-glycoprotein - *Mol. Pharmacol.*, **57**: 24-35.
- Ledy, K., 2002. Développement de biomarqueurs cellulaires de contamination chez plusieurs espèces aquatiques dulçaquicoles. Approche multiparamétrique *in situ* et au laboratoire. Thèse de Doctorat, Université de Metz, pp. 225.
- Lee, C. G. L., Gottesman, M. M., Cardarelli, C. O., Ramachandra, M., Jeang, K. T., Ambudkar, S. V., Pastan, I. et Dey, S. (1998) - HIV-1 protease inhibitors are substrates for the MDR1 multidrug transporter - *Biochemistry*, **37**: 3594-3601.
- Lee, C. H. (2001) - Induction of P-glycoprotein mRNA transcripts by cycloheximide in animal tissues : evidence that class I Pgp is transcriptionally regulated whereas class II Pgp is post-transcriptionally regulated - *Mol. Cell. Biochem.*, **216**: 103-110.
- Leglize, L. et Crochard, C. (1987) - Vérification expérimentale du choix de *Dreissena polymorpha* Pallas (lamellibranches) comme bioindicateur de pollution métallique - *Nat. Can. (Rév. Ecol. Syst.)*, **114**: 315-323.
- Lehnert, M. (1996) - Clinical Multidrug Resistance in Cancer: A Multifactorial Problem - *Eur. J. Cancer*, **32**: 912-920.
- Licht, T., Pastan, I., Gottesman, M. M. et Herrmann, N. F. (1996) - The multidrug resistance gene in gene therapy of cancer and hematopoietic disorders - *Ann. Hematol.*, **72**: 184-193.
- Livingstone, D. R., Chipman, J. K., Lowe, D. M., Minier, C., Mitchelmore, C. L., Moore, M. N., Peters, L. D. et Pipe, R. K. (2000) - Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis* L.) and other mytilids - *Int. J. Environ. Poll.*, **13**: 56-91.
- Loe, D. W., Deeley, R. G. et Cole, S. P. C. (1996) - Biology of the Multidrug Resistance-associated Protein, MRP - *Eur. J. Cancer*, **32**: 945-957.
- Loe, D. W., Deeley, R. G. et Cole, S. P. (1998) - Characterization of vincristine transport by the M 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione - *Cancer Res.*, **58**: 5130-5136.
- Lolkema, J. S., Poolman, B. et Konings, W. N. (1998) - Bacterial solute uptake and efflux systems - *Curr. Opin. Microbiol.*, **1**: 248-253.
- Loo, T. W. et Clarke, D. M. (1994) - Reconstitution of drug-stimulated ATPase activity following co-expression of each half of human P-glycoprotein as separate polypeptides - *J. Biol. Chem.*, **269**: 7750-7755.
- Loo, T. W. et Clarke, D. M. (1996) - The minimum functional unit of human P-glycoprotein appears to be a monomer - *J. Biol. Chem.*, **271**: 27488-27492.
- Loo, T. W. et Clarke, D. M. (1999a) - The transmembrane domains of the human multidrug resistance P-glycoprotein are sufficient to mediate drug binding and trafficking to the cell surface - *J. Biol. Chem.*, **274**: 24759-24765.
- Loo, T. W. et Clarke, D. M. (1999b) - The human multidrug resistance P-glycoprotein is inactive when its maturation is inhibited: potential for a role in cancer chemotherapy - *FASEB J.*, **13**: 1724-1732.
- Loo, T. W. et Clarke, D. M. (1999c) - Identification of residues in the drug-binding domain of human P-glycoprotein. Analysis of transmembrane segment 11 by cysteine-scanning mutagenesis and inhibition by dibromobimane - *J. Biol. Chem.*, **274**: 35388-35392.
- Loo, T. W. et Clarke, D. M. (1999d) - Determining the structure and mechanism of the human multidrug resistance P-glycoprotein using cysteine-scanning mutagenesis and thiol-modification techniques - *Biochim. Biophys. Acta*, **1461**: 315-325.



- Loo, T. W. et Clarke, D. M. (2000) - Identification of residues within the drug-binding domain of the human multidrug resistance P-glycoprotein by cysteine-scanning mutagenesis and reaction with dibromobimane - *J. Biol. Chem.*, **275**: 39272-39278.
- Loo, T. W. et Clarke, D. M. (2001) - Defining the drug-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein using a methanethiosulfonate analog of verapamil, MTS-verapamil - *J. Biol. Chem.*, **276**: 14972-14979.
- Lowe, S. W., Ruley, H. E., Jacks, T. et Housman, D. E. (1993) - p53 dependant apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents - *Cell*, **74**: 957-967.
- Lowe, S. W., Bodis, S., McClatchey, A., Remington, L., Ruley, H. E., Fisher, D. E., Housman, D. E. et Jacks, T. (1994) - p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo - *Science*, **266**: 807-810.
- Luker, G. D., Nilsson, K. R., Covey, D. F. et Piwnicaworms, D. (1999) - Multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein enhances esterification of plasma membrane cholesterol - *J. Biol. Chem.*, **274**: 6979-6991.
- Luoma, S. N. (1996) - The developing framework of marine ecotoxicology: pollutants as a variable in marine ecosystems? - *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **200**: 29-55.

## M

- Ma, Y. et Yao, J. N. (1999) - Comparison of photodegradative rate of rhodamine B assisted by two rinds of TiO<sub>2</sub> films - *Chemosphere*, **38**: 2407-2414.
- Mackie, G. L. (1993) - Biology of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and observations of mussel colonization on unionid bivalves in Lake St Clair of the Great Lakes. - In: Nalepa, T. F. & schloesser, D. W. (eds.): *Zebra mussel - Biology, impacts, and control* - Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 153-165.
- Marks, D. C., Su, G. M., Davey, R. A. et Davey, M. W. (1996) - Extended multidrug resistance in haematopoietic cells - *Brit. J. Haematol.*, **95**: 587-595.
- Martin, C., Berridge, G., Mistry, P., Higgins, C., Charlton, P. et Callaghan, R. (2000) - Drug binding sites on P-glycoprotein are altered by ATP binding prior to nucleotide hydrolysis - *Biochemistry*, **39**: 11901-11906.
- Martin, S. K., Oduola, A. M. et Milhous, W. K. (1987) - Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by verapamil - *Science*, **235**: 899-901.
- McFadzen, I., Eufemia, N. A., Heath, C., Epel, D., Moore, M. N. et Lowe, D. M. (2000) - Multidrug resistance in the embryos and larvae of the mussel *Mytilus edulis* - *Mar. Environ. Res.*, **50**: 319-323.
- Merritt, J. E., Sullivan, J. A., Drew, L., Khan, A., Wilson, K., Mulqueen, M., Harris, W., Bradshaw, D., Hill, C. H., Rumsby, M. et Warr, R. (1999) - The bisindolylmaleimide protein kinase C inhibitor, Ro 32-2241, reverses multidrug resistance in KB tumour cells - *Cancer Chemoth. Pharm.*, **43**: 371-378.
- Mersch, J., Wagner, P. et Pihan, J. C. (1996) - Copper in indigenous and transplanted zebra mussels in relation to changing water concentrations and body weight - *Environ. Toxicol. Chem.*, **15**: 886-893.
- Meschini, S., Marra, M., Calcabrini, A., monti, E., Gariboldi, M., Dolfini, E. et Arancia, G. (2002) - Role of the lung resistance-protein (LRP) in the drug sensitivity of cultured tumor cells - *Toxicol. In Vitro*, **16**: 389-398.
- Miller, D. S. (1995) - Daunomycin secretion by killifish renal proximal tubules - *Am. J. Physiol.-Reg. I.*, **269**: R370-R379.
- Minier, C., Akcha, F. et Galgani, F. (1993) - P-glycoprotein expression in *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* in polluted seawater - *Comp. Biochem. Phys. B*, **106**: 1029-1036.
- Minier, C. et Galgani, F. (1995) - Multi-xenobiotic resistance in *Mytilus edulis* - *Mar. Environ. Res.*, **39**: 267-270.
- Minier, C. et Moore, M. N. (1996) - Induction of multixenobiotic resistance in mussel blood cells - *Mar. Environ. Res.*, **42**: 389-392.
- Minier, C. et Moore, M. N. (1998) - Calcein accumulation in mussel blood cells - *Mar. Environ. Res.*, **46**: 425-428.
- Minier, C., Eufemia, N. et Epel, D. (1999) - The multi-xenobiotic resistance phenotype as a tool to biomonitor the environment - *Biomarkers*, **4**: 442-454.
- Minier, C., Borghi, V., Moore, M. N. et Porte, C. (2000) - Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel, *Mytilus galloprovincialis* - *Aquat. Toxicol.*, **50**: 167-176.
- Minier, C., Lelong, C., Djemel, N., Rodet, F., Tutundjian, R., Favrel, P., Mathieu, M. et Leboulenger, F. (2002) - Expression and activity of a multixenobiotic resistance system in the pacific oyster *Crassostrea gigas* - *Mar. Environ. Res.*, **54**: 455-459.

- Moreteau, J. C. et Khalanski, M., (1994) - Settlements and growth of *D. polymorpha* in the raw water circuit of the Cattenom nuclear power plant (Moselle, France). Proceedings of the 4th International zebra mussel conference, Madison, Wisconsin: pp. 553-574.
- Morris, D. I., Greenberger, L. M., Bruggemann, E. P., Cardarelli, C., Gottesman, M. M., Pastan, I. et Seamon, K. B. (1994) - Localization of the forskolin labeling sites to both halves of P-glycoprotein: similarity of the sites labeled by forskolin and prazosin - *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **46**: 329-337.
- Morton, B. (1969a) - Studies on the biology of *Dreissena polymorpha* Pallas. I General anatomy and morphology - *Proc. Malacol. Soc. Lond.*, **38**: 301-321.
- Morton, B. (1969b) - Studies on the biology of *Dreissena polymorpha* Pallas. III Population dynamics - *Proc. Malacol. Soc. Lond.*, **38**: 471-482.
- Morton, B. (1971) - Studies on the biology of *Dreissena polymorpha* Pallas. V Some aspects of filter-feeding and the effects of micro-organisms upon the rate of filtration - *Proc. Malacol. Soc. Lond.*, **39**: 280-301.
- Mouabadi, A. et Pihan, J. C. (1992) - The pumping behavior response of *Dreissena polymorpha* to pollutants. A method for toxicity screening. - In: Neumann, D. & Jenner, H. A. (eds.): *The zebra mussel Dreissena polymorpha* - Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Limnologie Aktuell. Vol.4, pp. 148-154.
- Mourez, M., Jehamo, M., Hofnung, M. et Dassa, E. (2000) - Rôle, fonctionnement et structure des transporteurs à ATP-Binding Cassette (ABC) - *Médecine Sciences*, **16**: 386-394.
- Muller, M., Meijer, C., Zaman, G. J. R., Borst, P., Scheper, R. J., Mulder, N. H., de Vries, E. G. E. et Jansen, P. L. M. (1994) - Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 13033-13037.

## N

- Naito, M., Hamada, H. et Tsuruo, T. (1988) - ATP/Mg<sup>2+</sup>-dependent binding of vincristine to the plasma membrane of multidrug resistant K562 cells - *J. Biol. Chem.*, **263**: 11887-11891.
- Naito, M. et Tsuruo, T. (1992) - Functionally active homodimer of P-glycoprotein in multidrug-resistant tumor cells - *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **185**: 284-290.
- Nakaune, R., Adachi, K., Nawata, O., Tomiyama, M., Akutsu, K. et Hibi, T. (1998) - A novel ATP-binding cassette transporter involved in multidrug resistance in the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum* - *Appl. Environ. Microb.*, **64**: 3983-3988.
- N'cho, M., Hobbs, J. A. et Brahmi, Z. (1999) - Over-expression of multidrug resistance P-glycoprotein inhibits NK granule-mediated lytic ability without affecting the Fas lytic pathway - *Hum. Immunol.*, **60**: 223-230.
- Neumann, D. et Jenner, H. A. (1992) - Studies on the ecology and the ecotoxicology of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. - In: Neumann, D. & Jenner, H. A. (eds.): *The zebra mussel Dreissena polymorpha* - Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Limnologie Aktuell. Vol.4, pp. 1-4.
- Nikaido, H. (1998) - Multiple antibiotic resistance and efflux - *Curr. Opin. Microbiol.*, **1**: 516-523.
- Nishi, K., Yoshida, M., Nishimura, M., Nishikawa, M., Horimouchi, S. et Beppu, T. (1992) - A leptomycin B resistance gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes a protein similar to the mammalian P-glycoproteins - *Mol. Microbiol.*, **6**: 761-769.
- Nishisaka, N., Jones, R. F., Maini, A., Morse, P., Wang, C. Y. et Haas, G. P. (1997) - Immunotherapy and gene therapy for renal cell carcinoma - *Urol. Oncol.*, **3**: 148-153.
- Noordhuis, R., Reeders, H. et Bij De Vaate, A. (1992) - Filtration rate and pseudofaeces production in zebra mussels and their application in water quality management. - In: Neumann, D. & Jenner, H. A. (eds.): *The zebra mussel Dreissena polymorpha* - Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Limnologie Aktuell. Vol.4, pp. 101-114.

## O

- O'Brien, M. L. et Tew, K. D. (1996) - Glutathione and Related Enzymes in Multidrug Resistance - *Eur. J. Cancer*, **32**: 967-978.
- Ojima, I., Bounaud, P. Y. et Oderda, C. F. (1998) - Recent strategies for the treatment of multi-drug resistance in cancer cells - *Expert Opin. Ther. Pat.*, **8**: 1587-1598.
- Orlowski, S., Mir, L. M., Belehradek, J. R. et Garrigos, M. (1996) - Effects of steroids and verapamil on P-glycoprotein ATPase activity : progesterone, desoxycorticosterone, corticosterone and verapamil are mutually non exclusive modulators - *Biochem. J.*, **317**: 515-522.

- Orlowski, S. et Garrigos, M. (1999) - Multiple recognition of various amphiphilic molecules by the multidrug resistance P-glycoprotein: Molecular mechanisms and pharmacological consequences coming from functional interactions between various drugs - *Anticancer Res.*, **19**: 3109-3123.
- Orozco, E., Gomez, C. et Perez, D. G. (1999) - Physiology and molecular genetics of multidrug resistance in *Entamoeba histolytica* - *Drug Resist. Update*, **2**: 188-197.

## P

- Panciera, M. (1967) - The toxicity of rhodamine B to eggs and larvae of *Crassostrea virginica* - *Proceedings of the National Shellfisheries Association*, **58**: 7-8.
- Parant, M. et Pain, S. (2001) - Potential use of multixenobiotic defense mechanism (MXDM) in *Dreissena polymorpha* as a biomarker for the monitoring of freshwater pollution - *Water Res.*, **35**: 3743-3748.
- Park, Y. B., Kim, H. S., Oh, J. H. et Lee, S. H. (2001) - The co-expression of p53 protein and P-glycoprotein is correlated to a poor prognosis in osteosarcoma - *Int. Orthop.*, **24**: 307-310.
- Pascaud, C., Garrigos, M. et Orlowski, S. (1998) - Multidrug resistance transporter P-glycoprotein has distinct but interacting binding sites for cytotoxic drugs and reversing agents - *Biochem. J.*, **333**: 351-358.
- Pauli-Magnus, C., von Richter, O., Burk, O., Ziegler, A., Mettang, T., Eichelbaum, M. et Fromm, M. F. (2000) - Characterization of the major metabolites of verapamil as substrates and inhibitors of P-glycoprotein - *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **293**: 376-382.
- Pearce, H. L., Safa, A. R., Bach, N. J., Winter, M. A., Cirtain, M. C. et Beck, W. T. (1989) - Essential features of the P-glycoprotein pharmacophore as defined by a series of reserpine analogs that modulate multidrug resistance - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 5128-5132.
- Pellerin-Massicotte, J. et Tremblay, R. (1998) - La fragilité lysosomale en tant que biomarqueur cytologique. - In: Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J. C., & Ramade, F. (eds.): *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement* - Tec & Doc Lavoisier, Paris, pp. 225-242.
- Persidis, A. (1999) - Cancer multidrug resistance - *Nat. Biotechnol.*, **17**: 94-95.
- Philippeau, G. (1986) - Comment interpréter les résultats d'une analyse en composantes principales ? - Stat-ITCF - Institut Technique des Céréales et des Fourrages, Paris, 63 p.
- Phillips, D. J. H. (1980) - Quantitative aquatic biological indicators - Applied Science Publ, pp. 488.
- Podsiadlowski, L., Matha, V. et Vilcinskas, A. (1998) - Detection of a P-glycoprotein related pump in *Chironomus* larvae and its inhibition by verapamil and cyclosporin A - *Comp. Biochem. Phys. B*, **121**: 443-450.
- Prasad, R., de Wergifosse, P., Goffeau, A. et Balzi, E. (1995) - Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, CDR1, conferring multiple resistance to drugs and antifungals - *Curr. Genet.*, **27**: 320-329.
- Profit, L., Eagling, V. A. et Back, D. J. (1999) - Modulation of P-glycoprotein function in human lymphocytes and Caco-2 cell monolayers by HIV-1 protease inhibitors - *AIDS*, **13**: 1623-1627.
- Protasov, A. A. (1998) - Shell color intensity as a phenotypic characteristic of populations of *Dreissena polymorpha* (Pall.) (Bivalvia, Mollusca) - *Russ. J. Ecol.*, **29**: 431-434.

## R

- Ramachandran, C., Mead, D., Wellham, L., Sauerteig, A. et Krishan, A. (1995) - Expression of drug resistance-associated mdr-1, GST Pi and topoisomerase II genes during cell cycle transverse - *Biochem. Pharmacol.*, **49**: 545-552.
- Ramoska, E. A., Spiller, H. A. et Myers, A. (1990) - Calcium Channel Blocker Toxicity - *Ann. Emerg. Med.*, **19**: 649-653.
- Rappa, G., Lorico, A., Flavell, R. A. et Sartorelli, A. C. (1997) - Evidence that the multidrug resistance protein (MRP) functions as a co-transporter of glutathione and natural produce toxins - *Cancer Res.*, **57**: 5232-5237.
- Raviv, Y., Pollard, H. B., Bruggemann, E. P., Pastan, I. et Gottesman, M. M. (1990) - Photosensitized labeling of a functional multidrug transporter in living drug resistant tumor cells - *J. Biol. Chem.*, **265**: 3975-3980.
- Reed, J. C. (2001) - Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery - *Trends Mol. Med.*, **7**: 314-319.
- Reeders, H. H., bij de Vaate, A. et Slim, F. J. (1989) - The filtration rate of *Dreissena polymorpha* (Bivalvia) in three Dutch lakes with reference to biological water quality management - *Freshwater Biol.*, **22**: 133-141.

- Reeders, H. H. et bij de Vaate, A. (1992) - Bioprocessing of polluted suspended matter from the water column by the zebra mussel (*Dreissena polymorpha* Pallas) - *Hydrobiologia*, **239**: 53-63.
- Regev, R. et Eytan, G. D. (1997) - Flip-flop of doxorubicin across erythrocyte and lipid membranes - *Biochem. Pharmacol.*, **54**: 1151-1158.
- Regev, R., Assaraf, Y. G. et Eytan, G. D. (1999) - Membrane fluidization by ether, other anesthetics, and certain agents abolishes P-glycoprotein ATPase activity and modulates efflux from multidrug-resistant cells - *Eur. J. Biochem.*, **259**: 18-24.
- Renes, J., de Vries, E. G., Nienhuis, E. F., Jansen, P. L. et Muller, M. (1999) - ATP- and glutathione-dependent transport of chemotherapeutic drugs by the multidrug resistance protein MRP1 - *Br. J. Pharmacol.*, **126**: 681-688.
- Ricciardi, A. et Rasmussen, J. B. (1998) - Predicting the identity and impact of future biological invaders: a priority for aquatic resource management - *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **55**: 1759-1765.
- Rieger, L., Rieger, J., Winter, S., Streffer, J., Esser, P., Dichgans, J., Meyermann, R. et Weller, M. (2000) - Evidence for a constitutive, verapamil-sensitive, non-P-glycoprotein multidrug resistance phenotype in malignant glioma that is unaltered by radiochemotherapy in vivo - *Acta Neuropathol.*, **99**: 555-562.
- Ringborg, U. et Platz, A. (1996) - Chemotherapy resistance mechanisms - *Acta Oncol.*, suppl. **5**: 76-80.
- Ringwood, A. H., Connors, D. E., Keppler, C. J. et DiNovo, A. A. (1999) - Biomarker studies with juvenile oysters (*Crassostrea virginica*) deployed in situ - *Biomarkers*, **4**: 400-414.
- Riordan, J. R. et Ling, V. (1979) - Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability - *J. Biol. Chem.*, **254**: 12701-12705.
- RIWA (1992) - Rapport Annuel, Tome B : La Meuse, RIWA, pp. 148.
- Robert, J. (1999) - Multidrug resistance in oncology: diagnostic and therapeutic approaches - *Eur. J. Clin. Invest.*, **29**: 536-545.
- Roepe, P. D. (1995) - The role of the MDR protein in altered drug translocation across tumor cell membranes - *Biochim. Biophys. Acta*, **1241**: 385-406.
- Rome, L. H., Kedersha, N. L. et Chugani, D. C. (1991) - Unlocking vaults : organelles in search of a function - *Trends Cell. Biol.*, **1**: 47-50.
- Roninson, I. B., Chin, J. E., Choi, K. G., Gros, P., Housman, D. E., Fojo, A., Shen, D. W., Gottesman, M. M. et Pastan, I. (1986) - Isolation of human *mdr* DNA sequences amplified in multidrug resistant KB carcinoma cells - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 4538-4542.
- Roovers, D. J., vanVliet, M., Bloem, A. C. et Lokhorst, H. M. (1999) - Idarubicin overcomes P-glycoprotein-related multidrug resistance: comparison with doxorubicin and daunorubicin in human multiple myeloma cell lines - *Leukemia Res.*, **23**: 539-548.
- Rosenberg, M. F., Callaghan, R., Ford, R. C. et Higgins, C. F. (1997) - Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis - *J. Biol. Chem.*, **272**: 10685-10694.
- Ross, D. D., Karp, J., Yang, W., Gao, Y., Abruzzo, L. V. et Doyle, L. A. (1998) - Expression of breast cancer resistance protein (BCRP) in blast cells from patients with acute myeloid leukemia (AML) - *Blood*, **92**: 386a.
- Ruetz, S., Delling, U., Braut, M., Schurr, E. et Gros, P. (1996) - The *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* confers cellular resistance to antimalarial drugs in yeast cells - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 9942-9947.

## S

- Sachs, C. W., Chambers, T. C. et Fine, R. L. (1999) - Differential phosphorylation of sites in the linker region of P-glycoprotein by protein kinase C isozymes  $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  and  $\zeta$  - *Biochem. Pharmacol.*, **58**: 1587-1592.
- Sandor, V., Fojo, T. et Bates, S. E. (1998) - Future perspectives for the development of P-glycoprotein modulators - *Drug Resist. Update*, **1**: 190-200.
- Sauna, Z. E. et Ambudkar, S. V. (2000) - Evidence for a requirement for ATP hydrolysis at two distinct steps during a single turnover of the catalytic cycle of human P-glycoprotein - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**: 2515-2520.
- Sauna, Z. E. et Ambudkar, S. V. (2001) - Characterization of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein. The two ATP hydrolysis events in a single catalytic cycle are kinetically similar but affect different functional outcomes - *J. Biol. Chem.*, **276**: 11653-11661.

- Sauna, Z. E., Smith, M. M., Muller, M., Kerr, K. M. et Ambudkar, S. V. (2001) - The mechanism of action of multidrug resistance-linked P-glycoprotein. Catalytic cycle of ATP hydrolysis by P-glycoprotein - *J. Bioenerg. Biomembr.*, **33**: 481-491.
- Scheffer, G. L., Wijngaard, P. L. J., Flens, M. J., Izquierdo, M. A., Slovak, M. L., Pinedo, H. M., Meijer, C. J. L. M., Clevers, H. C. et Scheper, R. J. (1995) - The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein - *Nat. Med.*, **1**: 578-582.
- Schinkel, A. H., Roelofs, E. M. et Borst, P. (1991) - Characterization of the human MDR3 P-glycoprotein and its recognition by P-glycoprotein-specific monoclonal antibodies - *Cancer Res.*, **51**: 2628-2635.
- Schinkel, A. H. (1997) - The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins - *Semin. Cancer Biol.*, **8**: 161-170.
- Schinkel, A. H. (1999) - P-glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier - *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **36**: 179-194.
- Schröder, H. C., Badria, F. A., Ayyad, S. N., Batel, R., Wiens, M., Hassanein, H. M. A., Kurelec, B. et Müller, W. E. G. (1998) - Inhibitory effects of extracts from the marine alga *Caulerpa taxifolia* and of toxin from *Caulerpa racemosa* on multidrug resistance in the marine sponge *Geodia cydonium* - *Environ. Toxicol. Chem.*, **5**: 119-126.
- Schuetz, E. G., Beck, W. T. et Schuetz, J. D. (1996a) - Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells - *Mol. Pharmacol.*, **49**: 311-318.
- Schuetz, E. G., Schinkel, A. H., Relling, M. V. et Schuetz, J. D. (1996b) - P-glycoprotein: A major determinant of rifampicin-inducible expression of cytochrome P4503A in mice and humans. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 4001-4005.
- Schuetz, E. G., Umbenhauer, D. R., Yasuda, K., Brimer, C., Nguyen, L., Relling, M. V., Schuetz, J. D. et Schinkel, A. H. (2000) - Altered expression of hepatic cytochromes P-450 in mice deficient in one or more *mdr1* genes - *Mol. Pharmacol.*, **57**: 188-197.
- Scotto, K. W., Biedler, J. et Melera, P. (1986) - Amplification and expression of genes associated with multidrug resistance in mammalian cells - *Science*, **232**: 751-755.
- Scotto, K. W. et Egan, D. A. (1998) - Transcriptional regulation of MDR genes - *Cytotechnology*, **27**: 257-269.
- Seelig, A. (1998) - A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein - *Eur. J. Biochem.*, **251**: 252-261.
- Seelig, A. et Landwojtowicz, E. (2000) - Structure-activity relationship of P-glycoprotein substrates and modifiers - *Eur. J. Pharm. Sci.*, **12**: 31-40.
- Senior, A. E., Al-Shawi, M. K. et Urbatsch, I. L. (1995) - The catalytic cycle of P-glycoprotein - *F.E.B.S. Lett.*, **377**: 285-289.
- Seree, E., Villard, P. H., Hever, A., Guigal, N., Puyou, F., Charvet, B., Pointsomma, H., Lechevalier, E., Lacarelle, B. et Barra, Y. (1998) - Modulation of MDR1 and CYP3A expression by dexamethasone: Evidence for an inverse regulation in adrenals - *Biochem. Biophys. Res. Co.*, **252**: 392-395.
- Servos, J., Haase, E. et Brendel, M. (1993) - Gene SNQ2 of *Saccharomyces cerevisiae*, which confers resistance to 4-nitroquinoline-N-oxide and other chemicals, encodes a 169 kDa protein homologous to ATP-dependent permeases - *Mol. Gen. Genet.*, **236**: 214-218.
- Shapiro, A. B. et Ling, V. (1994) - ATPase activity of purified and reconstituted P-glycoprotein from chinese hamster ovary cells - *J. Biol. Chem.*, **269**: 3745-3754.
- Shapiro, A. B. et Ling, V. (1997) - Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities - *Eur. J. Biochem.*, **250**: 130-137.
- Shapiro, A. B. et Ling, V. (1998) - Stoichiometry of coupling of rhodamine 123 transport to ATP hydrolysis by P-glycoprotein - *Eur. J. Biochem.*, **254**: 189-193.
- Shapiro, A. B., Fox, K., Lam, P. et Ling, V. (1999) - Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone - Evidence for a third drug-binding site - *Eur. J. Biochem.*, **259**: 841-850.
- Sheehan, D. et Power, A. (1999) - Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs - *Comp. Biochem. Phys. C*, **123**: 193-199.
- Shen, D. W., Fojo, A., Chin, J. E., Roninson, I. B., Richert, N., Pastan, I. et Gottesman, M. M. (1986) - Human multidrug-resistant cell lines : increased *mdr1* expression can precede gene amplification - *Science*, **232**: 643-645.
- Sheper, R. J., Broxterman, H. J., Scheffer, G. L., Kaaijk, P., Dalton, W. S., van Heijningen, T. H., van Kalken, C. K., Slovak, M. L., de Vries, E. G. et van der Valk, P. (1993) - Overexpression of a m(r) 110,000 vesicular protein in non-p-glycoprotein-mediated multidrug resistance - *Cancer Res.*, **53**: 1475-1479.

- Shtil, A. A., Turner, J. G., Durfee, J., Dalton, W. S. et Yu, H. (1999) - Cytokine-based tumor cell vaccine is equally effective against parental and isogenic multidrug-resistant myeloma cells: The role of cytotoxic T lymphocytes - *Blood*, **93**: 1831-1837.
- Sikic, B., Fischer, G., Lum, B., Halsey, J., Beketic-Oreskovic, L. et Chen, G. (1997) - Modulation and prevention of multidrug resistance by inhibitors of P-glycoprotein - *Cancer Chemoth. Pharm.*, **40**: S13-S19.
- Smart, P. L. et Laidlaw, I. M. S. (1977) - An evaluation of some fluorescent dyes for water tracing - *Water Resour. res.*, **13**: 15-33.
- Smart, P. L. (1984) - A review of the toxicity of twelve fluorescent dyes used for water tracing - *National Speleological Society Bulletin*, **46**: 21-33.
- Smital, T., Pivcevic, B. et Kurelec, B. (1996) - Reversal of multidrug resistance by extract from the marine alga *Caulerpa taxifolia* - *Period. Biol.*, **98**: 1197-1203.
- Smital, T. et Kurelec, B. (1997) - Inhibitors of the multixenobiotic resistance mechanism in natural waters: In vivo demonstration of their effects - *Environ. Toxicol. Chem.*, **16**: 2164-2170.
- Smital, T. et Kurelec, B. (1998a) - The chemosensitizers of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic invertebrates: a new class of pollutants - *Mutat. Res. - Fund. Mol. M.*, **399**: 43-53.
- Smital, T. et Kurelec, B. (1998b) - The activity of multixenobiotic resistance mechanism determined by rhodamine B-efflux method as a biomarker of exposure - *Mar. Environ. Res.*, **46**: 443-447.
- Smital, T., Sauerborn, R., Pivcevic, B. et Kurelec, B. (2000a) - Inhibition of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms by commercially used pesticides - *Mar. Environ. Res.*, **50**: 331-335.
- Smital, T., Sauerborn, R., Pivcevic, B., Krca, S. et Kurelec, B. (2000b) - Interspecies differences in P-glycoprotein mediated activity of multixenobiotic resistance mechanism in several marine and freshwater invertebrates - *Comp. Biochem. Phys. C*, **126**: 175-186.
- Smolders, R., Bervoets, L. et Blust, R. (2002) - Transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) as active biomonitors in a effluent-dominated river - *Environ. Toxicol. Chem.*, **21**: 1889-1896.
- Soimasuo, R., Aaltonen, T., Nikinmaa, M., Pellinen, J., Ristola, T. et Oikari, A. (1995) - Physiological toxicity of low-chloride bleached pulp and paper mill effluent on whitefish (*Coregonus lavaretus* L. s.l.): a laboratory exposure simulating lake pollution - *Ecotox. Environ. Safe.*, **31**: 228-237.
- Sprung, M. (1987) - Ecological requirements of developing *Dreissena polymorpha* eggs. - *Arch. Hydrobiol., Suppl.* **79**: 69-86.
- Sprung, M. et Rose, U. (1988) - Influence of food size and food quantity on the feeding of the mussel *Dreissena polymorpha* - *Oecologia*, **77**: 526-532.
- Sprung, M. (1989) - Field and laboratory observations of *Dreissena polymorpha* larvae: abundance, growth, mortality and food demands - *Arch. Hydrobiol.*, **115**: 537-561.
- Sprung, M. (1992) - Observations on shell growth and mortality of *Dreissena polymorpha* in lakes. - In: Neumann, D. & Jenner, H. A. (eds.): *The zebra mussel Dreissena polymorpha* - Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Limnologie Aktuell. Vol.4, pp. 19-28.
- Stanczykowska, A., Lawacz, W., Mattice, J. et Lewandowski, K. (1976) - Bivalves as a factor effecting circulation of matter in Lake Mikolajskie (Poland) - *Limnol. Oceanogr.*, **10**: 347-352.
- Strauss, B. E., Shivakumar, C., Deb, S. P., Deb, S. et Haas, M. (1995) - The MDR1 downstream promoter contains sequence-specific binding sites for wild-type p53 - *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **217**: 825-831.
- Sturm, A., Cravedi, J. P. et Segner, H. (2001) - Prochloraz and nonylphenol diethoxylate inhibit an *mdr1-like* activity *in vitro*, but do not alter hepatic levels of P-glycoprotein in trout exposed *in vivo* - *Aquat. Toxicol.*, **53**: 215-228.
- Szabo, K., Bakos, E., Welker, E., M., M., Goodfellow, H., Higgins, C., Varadi, A. et Sarkadi, B. (1997) - Phosphorylation site mutations in the human multidrug transporter modulate its Drug-stimulated ATPase activity - *J. Biol. Chem.*, **272**: 23165-23171.

## T

- Tachet, H., Richoux, P., Bournaud, M. et Usseglio-Polatera, P. (2000) - Invertébrés d'eau douce - Systématique, Biologie, Ecologie - CNRS Editions, Paris, pp. 588p.
- Takara, K., Tanigawara, Y., Komada, F., Nishiguchi, K., Sakaeda, T. et Okumura, K. (2000) - The novel anticancer drug KR5500 interacts with, but is hardly transported by, human P-glycoprotein - *Jpn. J. Cancer Res.*, **91**: 248-254.
- Teodori, E., Dei, S., Scapecchi, S. et Gualtieri, F. (2002) - The medicinal chemistry of multidrug resistance (MDR) reversing drugs - *Il Farmaco*, **57**: 385-415.

- Terao, T., Hisanaga, E., Sai, Y., Tamai, I. et Tsuji, A. (1996) - Active secretion of drugs from the small intestinal epithelium in rats by P-glycoprotein functioning as an absorption barrier - *J. Pharm. Pharmacol.*, **48**: 1083-1089.
- Terasaki, T. et Hosoya, K. (1999) - The blood-brain barrier efflux transporters as a detoxifying system for the brain - *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **36**: 195-209.
- Theodoulou, F. L. (2000) - Plant ABC transporters - *BBA-Biomembranes*, **1465**: 79-103.
- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M. M., Pastan, I. et Willingham, M. C. (1987) - Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 7735-7738.
- Thioulouse, J., Chessel, D., Dolédec, S. et Olivier, J. M. (1997) - ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software - *Stat. Comput.*, **7**: 75-83.
- Tissières, A., Mitchell, H. K. et Tracy, U. M. (1974) - Protein synthesis in salivary glands of *D. melanogaster*. Relation to chromosome puffs - *J. Mol. Biol.*, **84**: 389-398.
- Toomey, B. H. et Epel, D. (1993) - Multixenobiotic Resistance in *Urechis caupo* Embryos: Protection From Environmental Toxins - *Biol. Bull.*, **185**: 355-364.
- Toomey, B. H. et Epel, D. (1995) - A multixenobiotic transporter in *Urechis caupo* embryos : protection from pesticides ? - *Mar. Environ. Res.*, **39**: 299-302.
- Toomey, B. H., Kaufman, M. R. et Epel, D. (1996) - Marine bacteria produce compounds that modulate multixenobiotic transport activity in *Urechis caupo* embryos - *Mar. Environ. Res.*, **42**: 393-397.
- Török, M., Gutmann, H., Fricker, G. et Drewe, J. (1999) - Sister of p-glycoprotein expression in different tissues - *Biochem. Pharmacol.*, **57**: 833-835.
- Tripathy, N. K., Nabi, M. J., Sahu, G. P. et Anand Kumar, A. (1995) - Genotoxicity testing of two red dyes in the somatic and germ lines cells of *Drosophila* - *Food Chem. Toxicol.*, **33**: 923-927.
- Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S. et Sakurai, Y. (1981) - Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia *in vivo* and *in vitro* through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil - *Cancer Res.*, **41**: 1967-1972.
- Turriziani, O., Antonelli, G. et Dianzani, F. (2000) - Cellular factors involved in the induction of resistance of HIV to antiretroviral agents - *Int. J. Antimicrob. Ag.*, **16**: 353-356.
- Tutundjian, R., 2001. Caractérisation d'un système de résistance multixénobiotique (MXR) chez le turbot (*Scophthalmus maximus*). Thèse de Doctorat, Université du Havre, pp. 164.
- Tutundjian, R., Cachot, J., Leboulenger, F. et Minier, C. (2002a) - Genetic and immunological characterisation of a multixenobiotic resistance system in the turbot (*Scophthalmus maximus*) - *Comp. Biochem. Phys. B*, **132**: 463-471.
- Tutundjian, R., Minier, C., Le Foll, F. et Leboulenger, F. (2002b) - Rhodamine exclusion activity in primary cultured turbot (*Scophthalmus maximus*) hepatocytes - *Mar. Environ. Res.*, **54**: 443-447.

## U

- Ueda, K., Cornwell, M. M., Gottesman, M. M., Pastan, I., Roninson, I. B., Ling, V. et Riordan, J. R. (1986) - The *mdr1* gene, responsible for multidrug resistance, codes for P-glycoprotein - *Biochem. Biophys. Res. Co.*, **141**: 956-962.
- Ueda, K., Okamura, N., Hirai, M., Tanigawara, Y., Saeki, T., Kioka, N., Komano, T. et Hori, R. (1992) - Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone - *J. Biol. Chem.*, **267**: 24248-24252.
- Umeda, M. (1956) - Experimental study of xanthene dyes as carcinogenic agents - *Jpn. J. Cancer Res.*, **43**: 120-122.

## V

- Valverde, M. A., Bond, T. D., Hardy, S. P., Taylor, J. C., Higgins, C. F., Altamirano, J. et Alvarez-Leefmans, F. J. (1996) - The multidrug resistance P-glycoprotein modulates cell regulatory volume decrease - *E.M.B.O.J.*, **15**: 4460-4468.
- van den Elsen, J. M. H., Kuntz, D. A., Hoedemaeker, F. J. et Rose, D. R. (1999) - Antibody C219 recognizes an a-helical epitope on P-glycoprotein - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**: 13679-13684.
- van der Ost, R., Beyer, J. et Vermeulen, N. P. E. (2003) - Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment : a review - *Environ. Toxicol. Phar.*, **13**: 57-149.
- Van Veen, H. W., Venema, K., Bolhuis, H., Oussenko, I., Kok, J., Poolman, B., A.J.M., D. et Konings, W. N. (1996) - Multidrug resistance mediated by a bacterial homolog of the human multidrug transporter MDR1 - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 10668-10672.

- van Veen, H. W., Margolles, A., Putman, M., Sakamoto, K. et Konings, W. N. (1999) - Multidrug resistance in lactic acid bacteria: molecular mechanisms and clinical relevance - *Anton. Leeuw. Int. J. G.*, **76**: 347-352.
- Versantvoort, C. H., Broxterman, H. J., Bagrij, T., Scheper, R. J. et Twentyman, P. R. (1995) - Regulation by glutathione of drug transport in multidrug-resistant human lung tumour cell lines overexpressing multidrug resistance-associated protein - *Brit. J. Cancer*, **72**: 82-89.
- Viarengo, A. et Canesi, L. (1991) - Mussels as biological indicators of pollution - *Aquaculture*, **94**: 225-243.
- Vogelstein, B. et Kinzler, K. W. (1992) - p53 function and dysfunction - *Cell*, **70**: 523-526.

## W

- Wacher, V. J., Wu, C. Y. et Benet, L. Z. (1995) - Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P-450 3A and P-glycoprotein have implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy - *Mol. Carcinog.*, **13**: 129-134.
- Wadkins, R. et Roepe, P. (1997) - Biophysical aspects of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance - *Int. Rev. Cytol.*, **171**: 121-165.
- Waldmann, P., Pivcevic, B., Müller, W. E. G., Zahn, R. K. et Kurelec, B. (1995) - Increased genotoxicity of acetylaminofluorene by modulators of multixenobiotic resistance mechanism: studies with the freshwater clam *Corbicula fluminea* - *Mutat. Res.*, **342**: 113-123.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. et Gay, N. J. (1982) - Distantly related sequences in the a- and b-subunits of ATP-synthase, myosin, kinases, and others ATP-requiring enzymes and a common nucleotid binding fold - *E.M.B.O.J.*, **1**: 945-951.
- Wang, L. W., Chen, L. X., Walker, V. et Jacob, T. J. C. (1998) - Antisense to MDR1 mRNA reduces P-glycoprotein expression, swelling-activated Cl<sup>-</sup> current and volume regulation in bovine ciliary epithelial cells - *J. Physiol.-London*, **511**: 33-44.
- Wang, Q. J. et Beck, W. T. (1998) - Transcriptional suppression of multidrug resistance-associated protein (MRP) gene expression by wild-type p53 - *Cancer Res.*, **58**: 5762-5769.
- Waugh, G. D. et Key, D. (1967) - Experiments with rhodamine B and european flat oysters (*Crassostrea edulis*) - *Journal du Conseil Permanent International pour l'Exploration de la Mer*, **31**: 272-282.
- Webb, J. M. et Hansen, W. H. (1961) - Studies of the metabolism of rhodamine B - *Toxicol. Appl. Pharm.*, **3**: 86-95.
- Webb, J. M., Hansen, W. H., Desmond, A. et Fitzhugh, O. G. (1961) - Biochemical and toxicological studies of rhodamine B and 3,6-diaminofluoran - *Toxicol. Appl. Pharm.*, **3**: 696-706.
- Wilson, C., Seranno, A., Wasley, B., Bogenschutz, M., Shankar, A. et Wirth, D. (1989) - Amplification of a gene related to mammalian mdr genes in drug resistant *Plasmodium falciparum* - *Science*, **244**: 1184-1186.

## X

- Wu, C., Budding, M., Griffin, M. et Croop, J. (1991) - Isolation and characterization of *Drosophila* multidrug resistance gene homologues - *Mol. Cell. Biol.*, **11**: 3940-3948.
- Xu, D., Ye, D., Fisher, M. et Juliano, R. L. (2002) - Selective inhibition of P-glycoprotein expression in multidrug-resistant tumor cells by a designed transcriptional regulator - *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **302**: 963-971.

## Y

- Yeh, G. C., Lopaczynska, J., Poore, C. M. et Phang, J. M. (1992) - A new functional role for P-glycoprotein: efflux pump for benzo(alpha)pyrene in human breast cancer MCF-7 cells - *Cancer Res.*, **52**: 6692-6695.
- Yu, D. (1998) - The role of oncogene in drug resistance - *Cytotechnology*, **27**: 283-292.
- Yusa, K. et Tsuruo, T. (1989) - Reversal mechanism of multidrug resistance by verapamil: direct binding of verapamil to P-glycoprotein on specific sites and transport of verapamil outward across the plasma membrane of K562/ADM Cells. - *Cancer Res.*, **49**: 5002-5006.
- Yusa, K., Oh-hara, T., Yamazaki, A., Tsukahara, S., Satoh, W. et Tsuruo, T. (1990) - Cross-resistance to anti-HIV nucleoside analogs in multidrug-resistant human cells - *Biochem. Biophys. Res.*, **169**: 986-990.



**Z**

- Zaman, G. J. R., Flens, M. J., van Leusden, M. R., de Haas, M., Mulder, H. S., Lankelma, J., Pinedo, H. M., Scheper, R. J., Baas, F., Broxterman, H. J. et Borst, P. (1994) - The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 8822-8826.
- Zaman, G. J. R., Lankelma, J., van Tellingen, O., Beijnen, J., Dekker, H., Paulusma, C., Oude Elferink, R. P. J., Baas, F. et Borst, P. (1995) - Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 7690-7694.
- Zamora, J. M., Pearce, H. L. et Beck, W. T. (1988) - Physical-chemical properties shared by compounds that modulate multidrug resistance in human leukemic cells - *Mol. Pharmacol.*, **33**: 454-462.
- Zhou, Y., Gottesman, M. M. et Pastan, I. (1999) - Studies of human MDR1-MDR2 chimeras demonstrate the functional exchangeability of a major transmembrane segment of the multidrug transporter and phosphatidylcholine flippase - *Mol. Cell. Biol.*, **19**: 1450-1459.

## ANNEXES

## Liste des Annexes

- Annexe 1.** Qualité des eaux naturelles selon le SEQ-Eau (Système d'Evaluation de la Qualité de l'Eau) dans le cadre de la surveillance des cours d'eau français par le Réseau National de Bassin.
- Annexe 2.** Qualité physico-chimique de la Moselle à Ars-Sur-Moselle et Hauconcourt – Bilan des années 1998 à 2002.
- Annexe 3.** Le fuel oil n°2.
- Annexe 4.** Composition de l'eau minérale Cristalline.
- Annexe 5.** Données physico-chimiques de la Fensch.
- Annexe 6.** Données physico-chimiques de la Meuse à Chooz.
- Annexe 7.** Données physico-chimiques du Ton à Ecouvies.
- Annexe 8.** Données physico-chimiques de la Moselle à Golbey.
- Annexe 9.** Données physico-chimiques de la Thur sur les sites de Willer sur Thur et Staffelfelden.
- Annexe 10.** Données physico-chimiques de la Moselle à Pierre La Treiche et Liverdun et résultats de la régression multiple.
- Annexe 11.** PARANT, M. & PAIN, S. (2001) – Potential use of MultiXenobiotic Defence Mechanism (MXDM) in *Dreissena polymorpha* as a biomarker for the monitoring of freshwater pollution – Water Research, **35** (15) : 3743-3748.
- Annexe 12.** PAIN, S. & PARANT, M. (2003) – Response of MultiXenobiotic Defence Mechanism in *Dreissena polymorpha* exposed to environmental stress – Chemosphere, **52** :1105-1113.

**Annexe 1 : Qualité des eaux naturelles selon le SEQ-Eau (Système d'Evaluation de la Qualité de l'Eau) dans le cadre de la surveillance des cours d'eau français par le Réseau National de Bassin.**

**A : Légende des codes utilisés pour la description de la qualité des eaux.**

**B : Seuils et classes de qualité concernant toutes les altérations prises en compte par le SEQ-Eau hormis les micropolluants organiques et minéraux. La valeur seuil entre chaque classe de qualité est indiquée à droite de la case correspondante.**

**C : Seuils de qualité pour les micropolluants organiques (protection de l'écosystème) dont les niveaux ont été mesurés sur les sites étudiés au cours de ce travail (d'après Babut, 1997, *Seuils de qualité pour les micropolluants organiques et minéraux dans les eaux superficielles*, Synthèse).**

**D: Seuils de qualité pour les micropolluants minéraux (protection de l'écosystème) dont les niveaux ont été mesurés sur les sites étudiés au cours de ce travail (d'après Babut, 1997, *Seuils de qualité pour les micropolluants organiques et minéraux dans les eaux superficielles*, Synthèse).**

**Source : Système d'Evaluation de la Qualité de l'Eau des cours d'eau (SEQ-Eau version 1, principes généraux), Etudes des Agences de l'Eau n°64.**

A	1 A	Qualité Excellente
	1 B	Qualité Bonne
	2	Qualité Passable
	3	Qualité Médiocre
	M	Pollution excessive

**B 1 - Matières Organiques et Oxydables**

Oxygène dissous (mg/L)	8
Taux de saturation en Oxygène (%)	90
DBO5 (mg O <sub>2</sub> /L)	3
DCO (mg O <sub>2</sub> /L)	20
COD (mg C/L)	3
KMnO <sub>4</sub> (mg O <sub>2</sub> /L)	5
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	0,5
NKJ (mg N/L)	1

**2 - Matières Azotées**

NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	0,1
NKJ (mg N/L)	1
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /L)	0,03

**3 - Nitrates**

NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L)	2
---	---

**4 - Matières Phosphorées**

P total (mg/L)	0,05
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L)	0,1

**5 - Particules en suspension**

MES (mg/L)	5
Turbidité (NTU)	2
Transparence (m)	2

**6 - Couleur**

Couleur (mg/L PT/Co)	15
----------------------	----

**7 - Température**

Température (°C)	21,5
Δ T = Taval - Tamont (°C)	1,5

**8 - Minéralisation**

Conductivité (μS/cm)	2500
Chlorures (mg/L)	62,5
Sulfates (mg/L)	62,5
Calcium (mg/L) Min	24
Calcium (mg/L) Max	160
Magnésium (mg/L)	50
Sodium (mg/L)	200
Potassium (mg/L)	12
TA, TAC (d°F) Min	6
TA, TAC (d°F) Max	40
Dureté (d°F) Min	8
Dureté (d°F) Max	50

**9 - Acidification**

pH Min	6,5
pH Max	8,2
Aluminium (mg/L) pH < 6,5	0,005
Aluminium (mg/L) pH > 6,5	0,1

**10 - Micro-organismes**

Coliformes thermotolérants (U/100mL)	20
Streptocoques fécaux (U/100mL)	20
Coliformes totaux (U/100mL)	50

**11 - Phytoplancton**

Taux de saturation en Oxygène (%)	110
pH	8,0
Δ O <sub>2</sub> (jour-nuit) (mg/L)	3
Δ pH (jour-nuit)	0,3
Algues (unités/mL)	2500
Chlorophylle a + Phéopigments (μg/L)	10

Bleu	Vert	Jaune	Orange	Rouge
6	4	3		
70	50	30		
6	10	25		
30	40	80		
5	8	10		
7	10	12		
1,5	2,8	4		
2	4	6		
0,5	2	5		
2	4	10		
0,1	0,5	1		
10	25	50		
0,2	0,5	1		
0,5	1	2		
25	38	50		
35	70	105		
1,6	1,3	1		
58	100	200		
23,5	25	28		
2	2,5	3		
3000	3500	4000		
125	190	250		
125	190	250		
18	12			
230	300	500		
75	100	400		
225	250	750		
13,5	15	70		
4,5	3			
58	75	100		
6	4			
70	90	125		
6,0	5,5	4,5		
8,5	9,0	10		
0,01	0,05	0,1		
0,2	0,4	0,8		
100	1000	2000		
100	250	400		
500	5000	10000		
130	150	200		
8,5	9,0	9,5		
6	9	12		
0,7	1,1	1,4		
25000	50000	500000		
60	120	240		

C

Seuils	Eau (µg/L)				Sédiments (µg/kg ms)		MES (µg/kg)	
	1	2	3	4	1	2	1	2
<b>Micropolluants organiques</b>								
Acénaphène	-	-	-	-	-	-	-	-
Acénaphthylène	-	-	-	-	-	-	-	-
Aldicarbe	0,05	0,5	50	60	-	-	-	-
Aminotriazole	38	380	3800	272000	-	-	-	-
Anthracène	-	-	-	-	-	-	-	-
Atrazine	0,2	2	20	440	-	-	-	-
Atrazine Déséthylée	-	-	-	-	-	-	-	-
Benzo(a)anthracène	-	-	-	-	-	-	-	-
Benzo(a)pyrène	0,005	0,05	5	5	9	90	18	180
Benzo(b)fluoranthène	0,004	0,04	4	28	113	1500	226	3000
Benzo(g,h,i)pérylène	0,004	0,04	4	28	113	1500	226	3000
Benzo(k)fluoranthène	0,004	0,04	4	28	113	1500	226	3000
Carbendazime	0,007	0,07	7	100	-	-	-	-
Chlortoluron	1	10	24	3800	-	-	-	-
Chrysène	-	-	-	-	-	-	-	-
DDD op/pp'	0,006	0,06	0,6	5,2	-	-	-	-
DDE op/pp'	0,3	3,2	30	34	0,2	2	0,4	4
DDT op/pp'	0,002	0,02	0,2	2,4	1,6	16	3,2	32
Deltaméthrine	0,0002	0,002	0,02	4	0,1	1	0,2	2
Dibenzo(a,h)anthracène	-	-	-	-	-	-	-	-
Diuron	0,2	2	20	550	-	-	-	-
Endosulfan	0,02	0,2	0,3	7	0,25	2,5	0,5	5
Fluoranthène	0,004	0,04	4	28	113	1500	226	3000
Hexachlorobenzène	0,0007	0,07	7	12	4,5	45	9	90
Hexachlorobutadiène	0,1	1	120	130	16	160	32	320
Hexachlorocyclohexane α	-	-	-	-	-	-	-	-
Hexachlorocyclohexane β	-	-	-	-	-	-	-	-
Hexachlorocyclohexane δ	-	-	-	-	-	-	-	-
Hexachlorocyclohexane γ	0,01	0,1	1,1	22	0,03	0,3	0,06	0,6
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	0,004	0,04	4	28	113	1500	226	3000
Isoproturon	0,2	2	20	980	0,4	4	0,8	8
Linuron	0,5	5	50	360	-	-	-	-
Méthyl-2-fluoranthène	-	-	-	-	-	-	-	-
Méthyl-2-naphtalène	-	-	-	-	-	-	-	-
Parathion	-	-	-	-	-	-	-	-
PCB (ensemble)	0,001	0,01	2	2,4	2	22	4	44
Phénanthrène	-	-	-	-	-	-	-	-
Prosulfocan	-	-	-	-	-	-	-	-
Pyrène	-	-	-	-	-	-	-	-
Simazine	0,02	0,2	2,2	200	-	-	-	-
Tétrachloréthylène	50	500	5000	33000	250	2500	500	5000
Tétrachlorure de Carbone	35	350	35000	38000	-	-	-	-
Trichloréthylène	18	180	18000	23000	-	-	-	-
Trichlorobenzène-1,2,3	3	30	350	700	75	750	150	1500
Trichlorobenzène-1,2,4	3	30	350	700	75	750	150	1500
Trichlorobenzène-1,3,5	3	30	350	700	75	750	150	1500
Trifluraline	0,2	2	10	43	50	500	100	1000

Valeurs provisoires

D

	Eau (µg/L)				Sédiments (µg/kg ms)		MES (µg/kg)	
Seuils	1	2	3	4	1	2	1	2
<b>Micropolluants minéraux</b>								
Arsenic	10	100	270	1800	700	7000	1000	10000
Cadmium	-	-	-	-	700	4200	1000	6300
Chrome total	-	-	-	-	5200	52000	7800	78000
Cuivre	-	-	-	-	1900	19000	2800	28000
Mercure	0,07	0,7	3	21	130	170	200	1100
Nickel	-	-	-	-	1600	16000	2400	24000
Plomb	-	-	-	-	4100	41000	6100	61000
Zinc	-	-	-	-	124000	271000	186000	407000

*Annexe 2 : Qualité physico-chimique de la Moselle à Ars-Sur-Moselle et Hauconcourt – Bilan des années 1998 à 2002 (Source : BERM).*

	Moyenne		Minimum		Maximum	
	Ars / Moselle	Hauconcourt	Ars / Moselle	Hauconcourt	Ars / Moselle	Hauconcourt
<b>1 - Matières Organiques et Oxydables</b>						
Oxygène dissous (mg/L)						
Taux de saturation en Oxygène (%)						
DBO5 (mg O <sub>2</sub> /L)						
DCO (mg O <sub>2</sub> /L)						
COD (mg C/L)						
KMnO <sub>4</sub> (mg O <sub>2</sub> /L)						
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )						
NKJ (mg N/L)						
<b>2 - Matières Azotées</b>						
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )						
NKJ (mg N/L)						
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg NO <sub>2</sub> /L)						
<b>3 - Nitrates</b>						
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg NO <sub>3</sub> /L)						
<b>4 - Matières Phosphorées</b>						
P total (mg/L)						
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg PO <sub>4</sub> /L)						
<b>5 - Particules en suspension</b>						
MES (mg/L)						
Turbidité (NTU)						
Transparence (m)						
<b>6 - Couleur</b>						
Couleur (mg/L PT/Co)						
<b>7 - Température</b>						
Température (°C)						
Δ T = Taval - Tamont (°C)						
<b>8 - Minéralisation</b>						
Conductivité (μS/cm)						
Chlorures (mg/L)						
Sulfates (mg/L)						
Calcium (mg/L)						
Magnésium (mg/L)						
Sodium (mg/L)						
Potassium (mg/L)						
TA, TAC (d°F)						
Dureté (d°F)						
<b>9 - Acidification</b>						
pH						
Aluminium (mg/L)						
<b>10 - Micro-organismes</b>						
Coliformes thermotolérants (U/100mL)						
Streptocoques fécaux (U/100mL)						
Coliformes totaux (U/100mL)						
<b>11 - Phytoplancton</b>						
Taux de saturation en Oxygène (%)						
pH						
Δ O <sub>2</sub> (jour-nuit) (mg/L)						
Δ pH (jour-nuit)						
Algues (unités/mL)						
Chlorophylle a + Phéopigments (μg/L)						



### ***Annexe 3 : le FUEL OIL n°2***

#### **1 - Présentation du fuel oil n°2**

Les fuels sont des mélanges complexes d'alcanes, d'alcènes, de cycloalcanes et d'hydrocarbures aromatiques. Ils peuvent contenir de faibles quantités de composés soufrés, azotés et oxygénés. Les fuels les plus légers contiennent généralement moins de 5% d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (3 à 7 cycles). Ce taux peut atteindre plus de 20% dans le cas des fuels les plus lourds. Les fuels sont produits par distillation des produits pétroliers bruts (raffinage). Ils sont utilisés comme combustibles pour le chauffage domestique et industriel, ainsi que pour la production de vapeur et d'électricité. Le fuel oil n°2 est un composé appartenant à la catégorie des fuels les plus légers, présentant le plus faible pourcentage d'hydrocarbures aromatiques polycycliques. L'exposition aux fuels et notamment au fuel oil n°2 se fait généralement par voie cutanée et par inhalation et peut survenir au cours de leur production, leur stockage, leur distribution, leur utilisation et pendant l'entretien des équipements de chauffage. La contamination de l'environnement par ce composé peut également survenir à chacune des différentes étapes de leur production et de leur utilisation. Cependant, les données concernent essentiellement les déversements accidentels de ces substances dans les milieux aquatiques (*Fact sheet courtesy of National Oceanic and Atmospheric Administration ; <http://www.osp.noaa.gov/>*)

#### **2 - Toxicité du fuel oil n°2**

L'étude de la toxicité aiguë chez l'animal a donné les résultats suivants :

DL<sub>50</sub> (rat, voie orale) : 14.5 mL/kg

DL<sub>50</sub> (lapin, voie dermique) > 5 mL/kg

Sensibilisation chez le cobaye : négatif

Irritation dermique primaire chez le lapin : modérément irritant

Irritation des yeux chez le lapin : légèrement irritant

En ce qui concerne la toxicité chronique et la cancérogénicité, les résultats rapportés par l'IARC (International Agency for Research on Cancer ; <http://www.iarc.fr>) font état de quelques études montrant l'apparition de tumeurs cutanées chez des souris suite à l'application cutanée de fuel oil n°2. D'autres études ont montré que l'exposition au fuel oil n°2 induisait des aberrations chromosomiques dans la moelle osseuse chez le rat et des

mutations chez les bactéries et les cellules de mammifères en culture. Les fractions aromatiques de ce composé ont également induit des échanges de chromatides sœur chez les cellules de mammifères en culture. Les fractions contenant les hydrocarbures aromatiques de 4 à 7 cycles ont induit des mutations chez les bactéries. Chez l'homme, des études cas-témoin ont montré une augmentation de l'incidence de certains types de cancer suite à l'exposition à des fuels. L'ensemble de ces résultats a permis de classer le fuel oil n°2 au sein du groupe 3 défini par l'IARC. Cette classification signifie que les preuves de l'effet cancérigène sur l'homme sont trop réduites. De même, les données sur l'animal sont également trop peu probantes pour permettre une conclusion certaine quant à la cancérogénicité des composés fuels (*IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 1989, vol 45, p 239.*)

### **3 - Propriétés dans le cas de déversement accidentel dans les milieux aquatiques**

Le fuel oil n°2 est un produit pétrolier raffiné contenant des hydrocarbures assez légers. En cas de déversement accidentel dans les milieux aquatiques, une partie du produit est évaporé et l'autre partie est rapidement dispersée dans l'eau. Plus léger que l'eau, il présente une très faible viscosité ; ces propriétés l'empêche de s'accumuler au fond de l'eau et favorise sa dispersion dans la colonne d'eau par formation de petites gouttelettes. Le fuel oil n°2 est complètement dégradé par les micro-organismes sur des périodes de 1 à 2 mois. En terme de toxicité pour les organismes vivants dans la colonne d'eau, le fuel oil n°2 est considéré comme étant très toxique, en partie à cause de sa grande aptitude à se disperser dans la colonne d'eau et donc, à se rendre biodisponible pour les êtres vivants qui y vivent. Cependant, ce composé est rapidement dilué lorsqu'il est répandu dans les masses d'eau et l'observation d'effets toxiques chez les organismes est assez rare. Par contre, une importante mortalité chez les poissons a été observée dans le cas de dispersion dans des milieux aquatiques fermés, très peu profonds, ou dans des petits cours d'eau.

Sur les côtes marines, le fuel oil n°2 peut souiller les crustacés et les mollusques, mais ces derniers éliminent le produit en quelques semaines. Le fuel oil n°2 exerce une toxicité indirecte sur les oiseaux d'eau. La mortalité est en effet causée par ingestion durant le lissage des plumes, par noyade ou par hypothermie parce que leurs plumes sont colmatées par le fuel (*Fact sheet courtesy of National Oceanic and Atmospheric Administration ; <http://www.osp.noaa.gov/>*).

*Annexe 4 : Composition de l'eau minérale Cristalline.*

**Eau CRISTALLINE source VOSGIA**

	[ ] mg/L
Calcium	6,4
Magnésium	1,2
Sodium	3
Potassium	0,5
Bicarbonates	20
Sulfates	5
Chlorures	3
Nitrates	4

Extrait sec à 180°C : 30mg/L - pH 6,5

Source Vosgia, 68 380 Metzeral, France

***Annexe 5 : Données physico-chimiques de la Fensch.***

***A :*** Note de qualité attribuée à partir des valeurs moyennes et maximales des relevés de l'année 2001 sur les sites de Knutange (Amont), Sérémange (Aval 1) et Florange (en amont de Aval 2).

***B :*** Données concernant les micropolluants organiques et minéraux mesurés dans la Fensch à Sérémange (Aval 1). Les données présentées ont été acquises sur les matières en suspension (MES) et sont les moyennes de deux valeurs relevées en octobre et novembre 2001.

*Source BERM*

	Moyenne			Maximum		
	Knutange	Sérémange	Florange	Knutange	Sérémange	Florange
<b>1 - Matières Organiques et Oxydables</b>						
Oxygène dissous (mg/L)						
Taux de saturation en Oxygène (%)						
DBO5 (mg O <sub>2</sub> /L)						
DCO (mg O <sub>2</sub> /L)						
COD (mg C/L)						
KMnO <sub>4</sub> (mg O <sub>2</sub> /L)						
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )						
NKJ (mg N/L)						
<b>2 - Matières Azotées</b>						
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )						
NKJ (mg N/L)						
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /L)						
<b>3 - Nitrates</b>						
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L)						
<b>4 - Matières Phosphorées</b>						
P total (mg/L)						
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L)						
<b>5 - Particules en suspension</b>						
MES (mg/L)						
Turbidité (NTU)						
Transparence (m)						
<b>6 - Couleur</b>						
Couleur (mg/L PT/Co)						
<b>7 - Température</b>						
Température (°C)						
Δ T = Taval - Tamont (°C)						
<b>8 - Minéralisation</b>						
Conductivité (μS/cm)						
Chlorures (mg/L)						
Sulfates (mg/L)						
Calcium (mg/L)						
Magnésium (mg/L)						
Sodium (mg/L)						
Potassium (mg/L)						
TA, TAC (d°F)						
Dureté (d°F)						
<b>9 - Acidification</b>						
pH						
Aluminium (mg/L)						
<b>10 - Micro-organismes</b>						
Coliformes thermotolérants (U/100mL)						
Streptocoques fécaux (U/100mL)						
Coliformes totaux (U/100mL)						
<b>11 - Phytoplancton</b>						
Taux de saturation en Oxygène (%)						
pH						
Δ O <sub>2</sub> (jour-nuit) (mg/L)						
Δ pH (jour-nuit)						
Algues (unités/mL)						
Chlorophylle a + Phéopigments (μg/L)						

	MES (µg/kg)
<b>Micropolluants organiques</b>	
Acénaphène	50
Acénaphthylène	1500
Benzo(a)anthracène	1880
Benzo(a)pyrène	1935
Benzo(b)fluoranthène	2185
Benzo(ghi)peryène	1750
Benzo(k)fluoranthène	1120
Chrysène	1800
Dibenzo(a,h)anthracène	250
Fluoranthène	6345
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	1835
Méthyl-2-fluoranthène	50
Méthyl-2-naphtalène	50 / 2030
PCB 101	18,5
PCB 118	20,35
PCB 138	41,85
PCB 153	48,15
PCB 180	45,25
PCB 28	2,5
PCB 52	7,75
Phénanthrène	1870
Pyrène	3570

	MES (µg/kg)
<b>Micropolluants minéraux</b>	
Arsenic	15200
Cadmium	3650
Chrome total	142500
Cuivre	135500
Mercure	800
Nickel	44000
Plomb	264500
Zinc	5111000

***Annexe 6 : Données physico-chimiques de la Meuse à Chooz.***

***A : Données physico-chimiques acquises sur trois sites répartis en amont et en aval d'une centrale électronucléaire installée sur le cours de la Meuse à Chooz aux cours de deux campagnes de juillet (J0 et J14) et d'octobre (J14) 1999.***

***B : Données concernant les micropolluants organiques mesurés sur eau ou matières en suspension (MES) au cours de l'année 1999 à Ham sur Meuse. Les données présentées sont les moyennes de l'année.***

***Source BERM***

A

	Campagne de juillet 1999						Campagne d'octobre 1999		
	Amont		Aval 1		Aval 2		Amont	Aval 1	Aval 2
	J0	J28	J0	J28	J0	J28	J14	J14	J14
<b>1 - Matières Organiques et Oxydables</b>									
Oxygène dissous (mg/L)									
Taux de saturation en Oxygène (%)									
DBO5 (mg O <sub>2</sub> /L)	3,8	3,5	2,84	2,4	2,1	2,3	2,2	3,5	2,7
DCO (mg O <sub>2</sub> /L)	16,19	15,87	23,00	15,06	14,43	14,43	12,71	12,40	12,09
COD (mg C/L)									
KMnO <sub>4</sub> (mg O <sub>2</sub> /L)									
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	0,056	0,047	0,090	0,045	0,045	0,039	0,013	0,016	0,017
NKJ (mg N/L)	0,699	0,670	0,840	0,687	0,491	0,485	0,427	0,438	0,393
<b>2 - Matières Azotées</b>									
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	0,056	0,047	0,090	0,045	0,045	0,039	0,013	0,016	0,017
NKJ (mg N/L)	0,699	0,670	0,840	0,687	0,491	0,485	0,427	0,438	0,393
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /L)	0,018	0,014	0,017	0,013	0,009	0,009	0,011	0,009	0,009
<b>3 - Nitrates</b>									
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L)	6,69	6,24	6,66	1,30	1,32	1,35	2,74	2,73	2,60
<b>4 - Matières Phosphorées</b>									
P total (mg/L)	0,150	0,145	0,141	0,158	0,128	0,158	0,132	0,136	0,119
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L)	0,033	0,046	0,042	0,033	0,048	0,048	0,066	0,066	0,070
<b>5 - Particules en suspension</b>									
MES (mg/L)	10,29	13,14	13,00	13,71	13,29	15,29	11,43	12,00	11,14
Turbidité (NTU)									
Transparence (m)									
<b>6 - Couleur</b>									
Couleur (mg/L PT/Co)									
<b>7 - Température</b>									
Température (°C)	19	18,8	20	19,1	19,5	19,3	10,8	10,9	10,9
Δ T = Taval - Tamont (°C)	-	-	1	0,3	0,5	0,5	-	0,1	0,1
<b>8 - Minéralisation</b>									
Conductivité (μS/cm)	464	450	464	452	470	457	438	436	438
Chlorures (mg/L)	18,4	17,4	18,3	18,2	18	18,2	19	18,5	18,3
Sulfates (mg/L)	37,4	38,2	49,3	39,9	40,1	44	47,7	48,9	50
Calcium (mg/L)	71,8	71,8	74,35	71,5	73,9	73,1	80	80	79
Magnésium (mg/L)	4,32	4,43	4,47	4,57	4,64	4,8	5,5	5,6	5,5
Sodium (mg/L)	11,95	13,6	14,1	13,1	12,9	13,4	13,5	13,8	13,4
Potassium (mg/L)	3,28	2,94	3,07	3,17	3,14	3,25	3,2	3,2	3,1
TA, TAC (d°F)									
Dureté (d°F)									
<b>9 - Acidification</b>									
pH	8,32	7,8	8,33	7,84	8,32	7,8	8,24	8,24	8,33
Aluminium (mg/L)									
<b>10 - Micro-organismes</b>									
Coliformes thermotolérants (U/100mL)									
Streptocoques fécaux (U/100mL)									
Coliformes totaux (U/100mL)									
<b>11 - Phytoplancton</b>									
Taux de saturation en Oxygène (%)									
pH	8,32	7,8	8,33	7,84	8,32	7,8	8,24	8,24	8,33
Δ O <sub>2</sub> (jour-nuit) (mg/L)									
Δ pH (jour-nuit)									
Algues (unités/mL)									
Chlorophylle a + Phéopigments (μg/L)	32,99	37,38	34,76	43,45	43,73	30,09	22,05	22,05	13,83



B

	Eau (µg/L)	MES (µg/kg)
<b>Micro-polluants organiques</b>		
Anthracène	0,025	150
Atrazine	0,06	-
Atrazine Déséthylée	0,086	-
Benzo(a)anthracène	0,01	555
Benzo(a)pyrène	0,01	609
Benzo(b)fluoranthène	0,01	842
Benzo(ghi)peryène	0,05	678
Benzo(k)fluoranthène	0,01	412
Carbendazime	0,1	-
Chlortoluron	0,05	-
DDD op'	-	1
DDD pp'	-	1
DDE op'	-	1
DDE pp'	-	1
DDT op'	-	1
DDT pp'	-	1
Deltaméthrine	0,05	-
Diuron	0,061	-
Endosulfan a	0,005	1
Endosulfan b	0,005	1
Fluoranthène	0,78	1168
Hexachlorobenzène	-	1,3
Hexachlorobutadiène	0,005	1,1
Hexachlorocyclohexane α	0,005	1,0
Hexachlorocyclohexane β	0,01	1,0
Hexachlorocyclohexane γ	0,0054	1,2
Indénopyrène	0,05	599
Isoproturon	0,06	-
Linuron	0,05	-
PCB 101	-	2,4
PCB 118	-	2,8
PCB 126	-	1
PCB 138	-	3,9
PCB 153	-	3,7
PCB 169	-	1
PCB 180	-	2,5
PCB 28	-	1,3
PCB 52	-	1,5
PCB 77	-	1
Phénanthrène	0,025	397
Prosulfocan	0,1	-
Simazine	0,05	-
Tétrachloréthylène	0,11	-
Tétrachlorure de Carbone	0,1	-
Trichloréthylène	0,23	-
Trichlorobenzène-1,2,3	0,02	3,34
Trichlorobenzène-1,2,4	0,02	2,44
Trichlorobenzène-1,3,5	0,02	2
Trifluraline	0,005	-

***Annexe 7 : Données physico-chimiques du Ton à Ecouviez.***

***A : Qualité physico-chimique de l'eau du Ton à Ecouviez (Source BERM). La note de qualité a été attribuée à partir des valeurs moyennes et maximales des relevés de la période de janvier 1999 à juillet 2002.***

***B : Données physico-chimiques acquises sur deux sites répartis en amont et en aval du rejet d'une usine de pâte à papier installée sur le cours du Ton à deux dates (J0 et E21) en mai 2000.***

A

	Moyenne	Maximum
<b>1 - Matières Organiques et Oxydables</b>		
Oxygène dissous (mg/L)		
Taux de saturation en Oxygène (%)		
DBO5 (mg O <sub>2</sub> /L)		
DCO (mg O <sub>2</sub> /L)		
COD (mg C/L)		
KMnO <sub>4</sub> (mg O <sub>2</sub> /L)		
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L)		
NKJ (mg N/L)		
<b>2 - Matières Azotées</b>		
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L)		
NKJ (mg N/L)		
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /L)		
<b>3 - Nitrates</b>		
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L)		
<b>4 - Matières Phosphorées</b>		
P total (mg/L)		
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L)		
<b>5 - Particules en suspension</b>		
MES (mg/L)		
Turbidité (NTU)		
Transparence (m)		
<b>6 - Couleur</b>		
Couleur (mg/L PT/Co)		
<b>7 - Température</b>		
Température (°C)		
Δ T = Taval - Tamont (°C)		
<b>8 - Minéralisation</b>		
Conductivité (μS/cm)		
Chlorures (mg/L)		
Sulfates (mg/L)		
Calcium (mg/L)		
Magnésium (mg/L)		
Sodium (mg/L)		
Potassium (mg/L)		
TA, TAC (d°F)		
Dureté (d°F)		
<b>9 - Acidification</b>		
pH		
Aluminium (mg/L)		
<b>10 - Micro-organismes</b>		
Coliformes thermotolérants (U/100mL)		
Streptocoques fécaux (U/100mL)		
Coliformes totaux (U/100mL)		
<b>11 - Phytoplancton</b>		
Taux de saturation en Oxygène (%)		
pH		
Δ O <sub>2</sub> (jour-nuit) (mg/L)		
Δ pH (jour-nuit)		
Algues (unités/mL)		
Chlorophylle a + Phéopigments (μg/L)		

B

	Amont		Aval 1	
	J0	E21	J0	E21
<b>1 - Matières Organiques et Oxydables</b>				
Oxygène dissous (mg/L)	9,63	9,10	9,80	8,03
Taux de saturation en Oxygène (%)				
DBO5 (mg O <sub>2</sub> /L)	6,88	5,94	4,64	5,31
DCO (mg O <sub>2</sub> /L)	19,37	14,13	18,75	23,28
COD (mg C/L)				
KMnO <sub>4</sub> (mg O <sub>2</sub> /L)				
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	0,148	0,195	0,101	0,174
NKJ (mg N/L)	3,594	1,010	1,272	0,730
<b>2 - Matières Azotées</b>				
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	0,148	0,195	0,101	0,174
NKJ (mg N/L)	3,59	1,01	1,27	0,73
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /L)	0,031	0,049	0,029	0,049
<b>3 - Nitrates</b>				
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L)	1,30	1,60	1,45	1,06
<b>4 - Matières Phosphorées</b>				
P total (mg/L)	0,36	0,27	0,19	0,22
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L)	0,062	0,070	0,053	0,057
<b>5 - Particules en suspension</b>				
MES (mg/L)	88,57	39,40	48,86	39,00
Turbidité (NTU)				
Transparence (m)				
<b>6 - Couleur</b>				
Couleur (mg/L PT/Co)				
<b>7 - Température</b>				
Température (°C)	9	13	11,4	16,8
Δ T = Taval - Tamont (°C)	-	-	2,4	3,8
<b>8 - Minéralisation</b>				
Conductivité (μS/cm)	367	395	577	570
Chlorures (mg/L)	9	9,5	26,3	27,8
Sulfates (mg/L)	20,4	23,7	92,7	87
Calcium (mg/L)	71,5	77,7	88,7	87,7
Magnésium (mg/L)	3,78	3,7	4,03	3,7
Sodium (mg/L)	6,38	6,37	41	43,1
Potassium (mg/L)	2,59	1,98	5,64	4,98
TA, TAC (d°F)				
Dureté (d°F)				
<b>9 - Acidification</b>				
pH	8,2	7,8	8	7,9
Aluminium (mg/L)				
<b>10 - Micro-organismes</b>				
Coliformes thermotolérants (U/100mL)				
Streptocoques fécaux (U/100mL)				
Coliformes totaux (U/100mL)				
<b>11 - Phytoplancton</b>				
Taux de saturation en Oxygène (%)				
pH	8,2	7,8	8	7,9
Δ O <sub>2</sub> (jour-nuit) (mg/L)				
Δ pH (jour-nuit)				
Algues (unités/mL)				
Chlorophylle a + Phéopigments (μg/L)	30,84	17,01	13,46	13,08

*Annexe 8 : Données physico-chimiques acquises sur trois sites répartis en amont et en aval du rejet d'une papeterie installée sur le cours de la Moselle à Golbey aux cours de deux campagnes Avril et Mai 2000.*

	Amont		Rejet		Aval	
	Avril	Mai	Avril	Mai	Avril	Mai
<b>1 - Matières Organiques et Oxydables</b>						
Oxygène dissous (mg/L)						
Taux de saturation en Oxygène (%)						
DBO5 (mg O <sub>2</sub> /L)	1,44	2,16	1,12	2,43	2,24	2,61
DCO (mg O <sub>2</sub> /L)	7,91	10,02	23,54	26,32	21,84	15,50
COD (mg C/L)						
KMnO <sub>4</sub> (mg O <sub>2</sub> /L)						
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	0,087	0,068	0,072	0,07	0,07	0,07
NKJ (mg N/L)	0,509	0,54	0,632	0,57	0,60	0,60
<b>2 - Matières Azotées</b>						
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	0,087	0,068	0,072	0,07	0,07	0,07
NKJ (mg N/L)	0,509	0,54	0,632	0,57	0,60	0,60
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /L)	0,008	0,012	0,010	0,013	0,010	0,012
<b>3 - Nitrates</b>						
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L)	0,691	0,72	0,673	0,99	0,70	0,81
<b>4 - Matières Phosphorées</b>						
P total (mg/L)	0,066	0,128	0,075	0,13	0,10	0,14
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L)	0,037	0,073	0,037	0,073	0,04	0,07
<b>5 - Particules en suspension</b>						
MES (mg/L)	3,6	6,88	3,43	7,37	9,86	6
Turbidité (NTU)						
Transparence (m)						
<b>6 - Couleur</b>						
Couleur (mg/L PT/Co)						
<b>7 - Température</b>						
Température (°C)						
Δ T = Taval - Tamont (°C)						
<b>8 - Minéralisation</b>						
Conductivité (μS/cm)	88	96	262	277	159	162
Chlorures (mg/L)	10	9,3	22,4	25,6	15,3	17,5
Sulfates (mg/L)	6,4	8,5	34,9	29,8	17	19
Calcium (mg/L)	6,66	7,55	17,13	12	10,47	9,84
Magnésium (mg/L)	1,33	1,4	2,2	1,9	1,7	1,7
Sodium (mg/L)	7,78	8,2	34,0	32,6	17,96	18
Potassium (mg/L)	1,44	1,74	3,57	3,5	2,35	2,43
TA, TAC (d°F)						
Dureté (d°F)						
<b>9 - Acidification</b>						
pH	7,2	6,90	7,8	7,30	7,4	7,10
Aluminium (mg/L)						
<b>10 - Micro-organismes</b>						
Coliformes thermotolérants (U/100mL)						
Streptocoques fécaux (U/100mL)						
Coliformes totaux (U/100mL)						
<b>11 - Phytoplancton</b>						
Taux de saturation en Oxygène (%)						
pH	7,2	6,90	7,8	7,30	7,4	7,10
Δ O <sub>2</sub> (jour-nuit) (mg/L)						
Δ pH (jour-nuit)						
Algues (unités/mL)						
Chlorophylle a + Phéopigments (μg/L)	7,48	9,53	7,10	9,53	12,34	9,91

***Annexe 9 : Données physico-chimiques de la Thur sur les sites de Willer sur Thur et Staffelfelden.***

***A : Qualité physico-chimique. La note de qualité a été attribuée à partir des valeurs moyennes et maximales des relevés de l'année 2001.***

***B : Données concernant les micropolluants organiques et minéraux mesurés au cours de l'année 2001 à Staffelfelden. Les données acquises sur sédiments ont été mesurées à une seule date (03/10/01). Les données acquises sur eau brute sont les moyennes de l'année 2001.***

***Source BERM***

A

	Moyenne		Maximum	
	Willer Sur Thur	Staffelfelden	Willer Sur Thur	Staffelfelden
<b>1 - Matières Organiques et Oxydables</b>				
Oxygène dissous (mg/L)				
Taux de saturation en Oxygène (%)				
DBO5 (mg O <sub>2</sub> /L)				
DCO (mg O <sub>2</sub> /L)				
COD (mg C/L)				
KMnO <sub>4</sub> (mg O <sub>2</sub> /L)				
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )				
NKJ (mg N/L)				
<b>2 - Matières Azotées</b>				
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )				
NKJ (mg N/L)				
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg NO <sub>2</sub> /L)				
<b>3 - Nitrates</b>				
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg NO <sub>3</sub> /L)				
<b>4 - Matières Phosphorées</b>				
P total (mg/L)				
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg PO <sub>4</sub> /L)				
<b>5 - Particules en suspension</b>				
MES (mg/L)				
Turbidité (NTU)				
Transparence (m)				
<b>6 - Couleur</b>				
Couleur (mg/L PT/Co)				
<b>7 - Température</b>				
Température (°C)				
Δ T = Taval - Tamont (°C)				
<b>8 - Minéralisation</b>				
Conductivité (μS/cm)				
Chlorures (mg/L)				
Sulfates (mg/L)				
Calcium (mg/L)				
Magnésium (mg/L)				
Sodium (mg/L)				
Potassium (mg/L)				
TA, TAC (d°F)				
Dureté (d°F)				
<b>9 - Acidification</b>				
pH				
Aluminium (mg/L)				
<b>10 - Micro-organismes</b>				
Coliformes thermotolérants (U/100mL)				
Streptocoques fécaux (U/100mL)				
Coliformes totaux (U/100mL)				
<b>11 - Phytoplancton</b>				
Taux de saturation en Oxygène (%)				
pH				
Δ O <sub>2</sub> (jour-nuit) (mg/L)				
Δ pH (jour-nuit)				
Algues (unités/mL)				
Chlorophylle a + Phéopigments (μg/L)				

Micropolluants organiques	Sédiments (µg/kg)
Acénaphène	1550
Acénaphthylène	1000
Anthracène	1630
Benzo(a)anthracène	260
Benzo(a)pyrène	350
Benzo(b)fluoranthène	350
Benzo(g,h,i)pérylène	360
Benzo(k)fluoranthène	150
Chrysène	190
Dibenzo(a,h)anthracène	200
Fluoranthène	750
Hexachlorobenzène	20
Hexachlorobutadiène	10
Hexachlorocyclohexane alpha	10
Hexachlorocyclohexane bêta	10
Hexachlorocyclohexane delta	10
Hexachlorocyclohexane gamma	10
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	200
Méthyl-2-fluoranthène	80
PCB 101	27,0
PCB 118	13,0
PCB 126	5,0
PCB 138	14
PCB 153	14
PCB 169	5
PCB 180	5,0
PCB 28	6,0
PCB 52	14
PCB 77	5,0
Phénanthrène	2230
Pyrène	1220
Trichlorobenzène-1,2,3	10
Trichlorobenzène-1,2,4	10,0
Trichlorobenzène-1,3,5	10,0

Micropolluants organiques	Eau (µg/L)
Aldicarbe	2,16
Aminotriazole	0,1
Atrazine	0,023
Carbendazime	0,33
Chlortoluron	0,096
Deltamethrine	0,05
Diuron	0,1
Parathion	0,05
Simazine	0,025
Trifluraline	0,05

Micropolluants minéraux	Sédiments (µg/kg)
Arsenic	24
Cadmium	1,01
Chrome total	158
Cuivre	60
Mercure	8,32
Nickel	39
Plomb	92
Zinc	265



**Annexe 10 : Données physico-chimiques de la Moselle à Pierre La Treiche et Liverdun et résultats de la régression multiple.**

**A :** Qualité physico-chimique de la Moselle à Pierre La Treiche et Liverdun. La note de qualité a été attribuée à partir des valeurs moyennes, maximales et minimales des relevés de la période de août 2001 à octobre 2002.

**B :** Données concernant les micropolluants organiques mesurés sur eau ou matières en suspension (MES) de août à décembre 2001 à Liverdun. Les données présentées sont les moyennes ou la gamme des valeurs relevées lorsque ces dernières sont variables. Les données pour l'année 2002 ne sont pas encore disponibles à l'heure actuelle.

Source BERM

**C :** Résultats de la régression multiple (chapitre 3.4) mettant en évidence la contribution relative des paramètres physico-chimiques à la variation de la réponse de l'activité MDMX in situ. Les tableaux indiquent pour chaque paramètre le coefficient de corrélation partielle ( $r_{\text{Pearson}}$ ;  $\alpha=0.05$ ) obtenu pour chaque site et son niveau de significativité ( $p$ ).

	moyenne		maximum		minimum	
	Pierre LT	Liverdun	Pierre LT	Liverdun	Pierre LT	Liverdun
1 - Matières Organiques et Oxydables						
Oxygène dissous (mg/L)						
Taux de saturation en Oxygène (%)						
DBO5 (mg O <sub>2</sub> /L)						
DCO (mg O <sub>2</sub> /L)						
COD (mg C/L)						
KMnO <sub>4</sub> (mg O <sub>2</sub> /L)						
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )						
NKJ (mg N/L)						
2 - Matières Azotées						
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )						
NKJ (mg N/L)						
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg NO <sub>2</sub> /L)						
3 - Nitrates						
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg NO <sub>3</sub> /L)						
4 - Matières Phosphorées						
P total (mg/L)						
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg PO <sub>4</sub> /L)						
5 - Particules en suspension						
MES (mg/L)						
Turbidité (NTU)						
Transparence (m)						
6 - Couleur						
Couleur (mg/L PT/Co)						
7 - Température						
Température (°C)						
D T = Taval - Tamont (°C)						
8 - Minéralisation						
Conductivité (µS/cm)						
Chlorures (mg/L)						
Sulfates (mg/L)						
Calcium (mg/L)						
Magnésium (mg/L)						
Sodium (mg/L)						
Potassium (mg/L)						
TA, TAC (d°F)						
Dureté (d°F)						
9 - Acidification						
pH						
Aluminium (mg/L)						
10 - Micro-organismes						
Coliformes thermotolérants (U/100mL)						
Streptocoques fécaux (U/100mL)						
Coliformes totaux (U/100mL)						
11 - Phytoplancton						
Taux de saturation en Oxygène (%)						
pH						
D O <sub>2</sub> (jour-nuit) (mg/L)						
D pH (jour-nuit)						
Algues (unités/mL)						
Chlorophylle a + Phéopigments (µg/L)						

	MES (µg/kg)
<b>Micropolluants organiques</b>	
Acénaphène	50
Acénaphylène	50-100
Anthracène	50-1673
Benzo(a)anthracène	50-238
Benzo(a)pyrène	62-405
Benzo(b)fluoranthène	256-560
Benzo(ghi)peryène	50-422
Benzo(k)fluoranthène	139-265
Chrysène	75-410
DDD op'	20
DDD pp'	20
DDE op'	20
DDE pp'	20
DDT op'	20
DDT pp'	20
Dibenzo(a,h)anthracène	50-135
Endosulfan a	20
Endosulfan b	20
Fluoranthène	413-1030
Hexachlorobenzène	20
Hexachlorobutadiène	20
Hexachlorocyclohexane α	20
Hexachlorocyclohexane β	20
Hexachlorocyclohexane δ	20
Hexachlorocyclohexane γ	20
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	100-840
Méthyl-2-fluoranthène	50
Méthyl-2-naphtalène	50-2685
PCB 101	20-25
PCB 118	20
PCB 126	20
PCB 138	20
PCB 153	20
PCB 169	10
PCB 180	10
PCB 28	25-50
PCB 52	50
PCB 77	25
Phénanthrène	189-510
Pyrène	505-1205

	Eau brute (µg/L)
<b>Micropolluants organiques</b>	
Aminotriaz	1
AOX	14-164
Atrazine	0,025
Atrazine Déséthylée	0,05
Carbendazime	0,025
Chlortoluron	0,02
Deltaméthrine	0,01
Diuron	0,04
Endosulfan a	0,05
Endosulfan b	0,004
Hexachlorocyclohexane α	0,004
Hexachlorocyclohexane β	0,004
Hexachlorocyclohexane δ	0,004
Hexachlorocyclohexane γ	0,004
Isoproturon	0,079-0,296
Linuron	0,02
Prosulfocan	0,02
Simazine	0,025
Tétrachloréthylène	0,2
Tétrachlorure de Carbone	0,1
Trichlorobenzène-1,2,3	0,05
Trichlorobenzène-1,2,4	0,05
Trifluraline	0,004

	MES (µg/kg)
<b>Micropolluants minéraux</b>	
Arsenic	8,5-26,3
Cadmium	1-7,2
Chrome total	39-93,1
Cuivre	23,7-59,7
Mercure	1-1,4
Nickel	37,5-59,7
Plomb	40,7-95,5
Zinc	172,1-501,3

DBO <sub>5</sub>	r	p
Ars Sur Moselle	0,787	5,48E-08
Hauconcourt	0,824	1,20E-09
Pierre La Treiche	-0,100	5,80E-01
Liverdun	0,554	8,32E-04

Chlorophylle a	r	p
Ars Sur Moselle	-0,437	0,01102
Hauconcourt	0,377	0,02553
Pierre La Treiche	0,548	0,00096
Liverdun	0,069	0,70630

NO <sub>2</sub>	r	p
Ars Sur Moselle	0,409	1,82E-02
Hauconcourt	-0,544	7,30E-04
Pierre La Treiche	-0,457	7,49E-03
Liverdun	0,022	9,04E-01

O <sub>2</sub> %	r	p
Ars Sur Moselle	-0,625	0,00010
Hauconcourt	-0,480	0,00355
Pierre La Treiche	-0,253	0,15500
Liverdun	-0,426	0,01333

Conductivité	r	p
Ars Sur Moselle	-0,515	2,15E-03
Hauconcourt	-0,083	6,40E-01
Pierre La Treiche	-0,483	4,40E-03
Liverdun	-0,452	8,25E-03

MES	r	p
Ars Sur Moselle	-0,519	0,00199
Hauconcourt	-0,436	0,00876
Pierre La Treiche	0,478	0,00494
Liverdun	-0,074	0,68760

PO <sub>4</sub>	r	p
Ars Sur Moselle	-0,605	1,92E-04
Hauconcourt	-0,455	5,99E-03
Pierre La Treiche	0,214	2,32E-01
Liverdun	-0,278	1,18E-01

COD	r	p
Ars Sur Moselle	-0,248	0,16391
Hauconcourt	0,587	0,00021
Pierre La Treiche	0,031	0,86718
Liverdun	0,604	0,00020

P	r	p
Ars Sur Moselle	-0,249	1,62E-01
Hauconcourt	0,185	2,88E-01
Pierre La Treiche	0,671	1,91E-05
Liverdun	-0,654	3,63E-05

NH <sub>4</sub>	r	p
Ars Sur Moselle	-0,648	0,00005
Hauconcourt	-0,054	0,76009
Pierre La Treiche	-0,077	0,66953
Liverdun	0,408	0,01836

NO <sub>3</sub>	r	p
Ars Sur Moselle	-0,078	6,64E-01
Hauconcourt	0,595	1,65E-04
Pierre La Treiche	-0,031	8,67E-01
Liverdun	-0,075	6,82E-01

DCO	r	p
Ars Sur Moselle	0,563	0,00065
Hauconcourt	-0,092	0,60475
Pierre La Treiche	-0,026	0,88752
Liverdun	-0,194	0,27824

N total	r	p
Ars Sur Moselle	0,182	3,10E-01
Hauconcourt	-0,067	7,06E-01
Pierre La Treiche	0,406	1,92E-02
Liverdun	0,337	5,53E-02

pH	r	p
Ars Sur Moselle	-0,024	0,89446
Hauconcourt	-0,272	0,11350
Pierre La Treiche	0,333	0,05859
Liverdun	-0,004	0,98174



PERGAMON

www.elsevier.com/locate/watres

Wat. Res. Vol. 35, No. 15, pp. 3743–3748, 2001

© 2001 Elsevier Science Ltd. All rights reserved

Printed in Great Britain

0043-1354/01/\$ - see front matter

PII: S0043-1354(01)00074-4

## RESEARCH NOTE

# POTENTIAL USE OF MULTIXENOBIOTIC DEFENSE MECHANISM (MXDM) IN *DREISSENA POLYMORPHA* AS A BIOMARKER FOR THE MONITORING OF FRESHWATER POLLUTION

MARC PARANT\* and SANDRINE PAIN

Université de METZ, UFR Sci-FA, Laboratoire EBSE, Equipe de recherche en Production des Ecosystèmes et Écotoxicologie, Campus Bridoux, Rue du Général Delestraint, 57070 METZ Borny, France

(First received 9 May 2000; accepted in revised form 11 January 2001)

**Abstract**—Multixenobiotic defense mechanism (MXDM) has been recently described in marine mussels as potential biomarker for the monitoring of water pollution by organic compounds. In this paper, the measurement of MXDM activity was achieved in a freshwater bivalve, *Dreissena polymorpha*. Two methods were tested and compared. The first one (MXDM associated ATPase activity) is an indirect method based on the evaluation of the inorganic phosphate production during MXDM activity. The second one (MXDM efflux activity) consists in the measurement of a dye (Rhodamine B) efflux from gill cells in living organisms. Both methods were optimized and evaluated for *in situ* studies. The results showed a significant induction (4.5 fold) of the MXDM efflux activity after the implantation of organisms for 21 days in a high polluted site. This preliminary study suggests a potential use of the MXDM efflux activity in *Dreissena polymorpha* as a biomarker for the monitoring of freshwater pollution by organic compounds. © 2001 Elsevier Science Ltd. All rights reserved

**Key words**—MXDM, P-170, bivalve, *Dreissena polymorpha*, biomarker, detoxication, ATPase

## INTRODUCTION

In nature, all organisms are daily exposed to potentially harmful compounds. In this way, multixenobiotic defense mechanism (MXDM) acts as a first line defense mechanism (Bard, 2000). It is mediated by a P-glycoprotein called Pgp or P170 (Germann and Chambers, 1998). Briefly, this protein is located in the membrane and acts as an ATP-dependent pump by preventing the entering of organic compounds into the cell and facilitating their elimination. Its earliest role probably was the protection of the cell from natural toxins but this protein can also preserve organisms from new man-made chemical compounds (Epel, 1998). This mechanism has been well studied in mammals (Juliano and Ling, 1976; Schinkel, 1997; Ueda *et al.*, 1999). Recent evidences indicate that similar mechanism is also present in aquatic invertebrates and that it may be of interest in monitoring organic pollution in water (Kurelec and Pivcevic, 1991; Minier *et al.*, 1993).

In this study, we optimized two approaches for the measurement of MXDM activity in the freshwater

bivalve *Dreissena polymorpha*. The first one is an indirect evaluation which consists in the measurement of inorganic phosphate produced during ATP hydrolysis. The second one is a direct method which allows the measurement of a dye efflux from gill cells. For both methods, experimental conditions have been optimized. In order to test the potential use of MXDM activity as a biomarker for the monitoring of freshwater pollution, both approaches were achieved by *in situ* experiments.

## MATERIALS AND METHODS

*Organisms*

*Dreissena polymorpha* ( $2 \pm 0.5$  cm in shell length) were collected in the Moselle river (METZ, France). Organisms were carried to the laboratory in original water. They were kept under laboratory conditions for 8 days prior to experiments, i.e. dechlorinated water with continuous oxygen changed every two days, daily fed with commercial frozen food (Nauplium). After 8 days under laboratory conditions, organisms were called depurated organisms.

*Determination of MXDM associated ATPase activity*

ATPase activity was measured by using a colorimetric method to estimate the amount of inorganic phosphate as previously described with some modifications (Lanzetta *et al.*, 1979; Baykov *et al.*, 1988).

\*Author to whom all correspondence should be addressed.

E-mail: parant@sciences.univ-metz.fr

Briefly, microsomal fractions (10  $\mu$ g of protein) were incubated at 30°C for 60 min in the reaction buffer (Hepes 10 mM, KCl 100 mM,  $MgCl_2$  5 mM, EGTA 1 mM and sodium azide 1 mM) in the presence of ouabain 1 mM and ATP 0.5 mM. When indicated, verapamil 25  $\mu$ M was included. Reactions were stopped by addition of one volume of the color reagent (malachite green 3 mM, ammonium molybdate 12 mM, Triton X-100 0.2% v/v) with four volumes of the solution to be analyzed. After 2 min, sodium citrate was added to a final concentration of 3.6% w/v. After 20 min, light absorption was measured at 630 nm. The difference between activities in the presence and in the absence of verapamil was referred to as the MXDM associated ATPase activity.

The amount of inorganic phosphate was measured by using a standard curve prepared with  $KH_2PO_4$  in a concentration range between 1 and 10  $\mu$ M.

Protein concentration was measured according to Lowry *et al.* (1951).

ATPase activities were expressed as nmoles of inorganic phosphate/min/mg protein.

#### Efflux experiments

Efflux experiments were carried out according to a recently described protocol (Smital and Kurelec, 1997) with some modifications. One experiment could be divided into four steps: acclimation, loading, washes and efflux. Ten mussels are used for one experiment. For acclimation, mussels were grouped in little nets (5 mussels per net) and placed in dechlorinated water with continuous oxygen for 15 min. For loading, the nets of 5 mussels were placed in a light-protected beaker and exposed to dechlorinated water containing 5  $\mu$ M of rhodamine B (RB) (150 mL/net) with continuous oxygen for a period of 4 h. After the loading period, mussels were washed three-times in dechlorinated water (150 mL per net) for 2 min. The last step was achieved by immersing one group of five organisms in 30 mL of dechlorinated water and the second group in 30 mL of the same medium containing 30  $\mu$ M of verapamil. During the 1 h efflux period 100  $\mu$ L of each medium were transferred every 5 min in duplicate to a 96-well microplate and the fluorescence of effluxed RB was immediately measured on a Fluostar (BMG Lab Technologies). 544 and 590 nm filters were, respectively, used for excitation and emission.

Concentrations of RB were calculated by using a standard curve of RB from 0.5 to 1.8  $\mu$ M.

Results were plotted and the rate of RB efflux is then calculated from the linear part of the curve. The difference between the rate obtained in the absence and in the presence of verapamil during the efflux step is called MXDM efflux activity.

#### In situ experiment

Depurated organisms were implanted in the TON river (ECOUVIEZ, France) downstream (3 kilometers) of chlorine bleached pulp and paper mill effluents. This site has been previously shown to be a highly polluted site due to the presence of organo-halogenated compounds (Hayer *et al.*, 1996). After 21 days, organisms were collected and carried to the laboratory in original water.

For the measurement of ATPase activity, gill tissues were dissected out within 1–2 h after collection, damp dried and stored at –80°C prior to analysis.

For efflux measurement, organisms were kept in original water with continuous oxygen prior to analysis.

#### AOX determination

Adsorbable organic halogens (AOX) determination was performed according to the German standard method (DIN, 1985) using an ERALY organic halide analyzer.

The results are expressed as  $\mu$ g organically bound chlorine per liter ( $\mu$ g/L).

## RESULTS

### Measurement of MXDM associated ATPase activity

It is now well established that P-170 pump in human and the equivalent mechanism in bivalves are ATP-dependent mechanisms (Kurelec *et al.*, 1996; Borst and Schinkel, 1997; Parant, 1998). Moreover, verapamil is currently used as a high affinity substrate for these pumps (Doppenschmitt *et al.*, 1999). In our method, microsomes of gill cells are prepared and ATP hydrolysis is measured in the presence and in the absence of verapamil. Logically, ATP hydrolysis must be higher in the presence of verapamil due to the activation of functional pumps in microsomes.

As observed in Fig. 1, a difference in the production of inorganic phosphate appeared after 15 min of incubation. After calculation, we can observe that this difference increased quite linearly from 15 min to 1 h. This observation suggests a constant activity of the pumps. These results are similar to those previously described for ATP hydrolysis measurements (Hooijberg *et al.*, 1997). The presence of numerous ATP dependent mechanisms in microsomal fractions explains the high level of unspecific production of inorganic phosphate.

In literature (Hooijberg *et al.*, 1997), it is hypothesized that membrane pumps for the elimination of xenobiotics act by a Michaelis–Menten behavior. As shown in Fig. 2, our results confirm this hypothesis. After the linearisation of this curve by using the Lineweaver-Burk model, an apparent  $K_m$  of 2.4  $\mu$ M is calculated for verapamil.

The proportionality between ATPase activity and the amount of microsomal fraction was observed from 5 to 20  $\mu$ g of protein in the microsomal fraction (data not shown). According to these results, the use

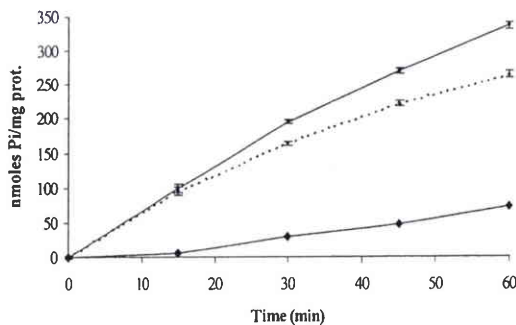


Fig. 1. Time course response of MXDM associated ATPase activity in microsomal fractions from gill tissues of *Dreissena polymorpha*. Phosphate production was measured as described in Materials and Methods at different times in the presence (full line) or in the absence (dashed line) of verapamil (25  $\mu$ M). Difference between 25 and 0  $\mu$ M verapamil was calculated (♦). Data are means  $\pm$  S.D. of 3 values. Results are representative of three experiments.



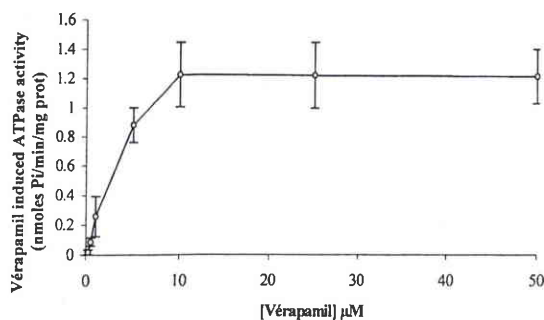


Fig. 2. Dose response of MXDM associated ATPase activity. MXDM associated ATPase activity was measured as described in Materials and Methods. For each concentration of verapamil, the value is the difference between the assay in the presence and in the absence of verapamil. Data are means  $\pm$  S.D. of 3 values. In some cases, the standard deviation bars are smaller than the symbols. Results are representative of three experiments.

of 10  $\mu$ g of microsomal fraction was decided for current test.

#### Optimization of the efflux method

The efflux method is based on mussels filtration. During the loading period, RB is present at a high concentration in the medium and the filtration allowed the dye to enter the gill cells by passive diffusion. After washing, mussels are placed in a clean medium (efflux medium) and the release of RB is observed. If the efflux medium is dechlorinated water, the release of RB is due to the cumulated action of MXDM and passive diffusion. However, if the efflux medium is supplied with verapamil, the concentration of verapamil is sufficient to saturate the pumps and does not allow the elimination of RB by this way. Thus, the release of RB is only due to passive diffusion. The difference between the two releasing rates represents the specific activity of MXDM and is called MXDM efflux activity.

RB is a light sensitive compound which could be submitted to a *N*-de-ethylation (Ma and Yao, 1999). In order to be sure of the evaluation of RB concentrations all over the experiment, our first approach was the analysis of RB stability.

As shown in Fig. 3, we observed a time-dependent decrease of RB fluorescence, mainly during the first 30 min. In order to control this light sensitive evolution, a standard curve of RB was prepared at the beginning of the experiment and the fluorescence of these samples was evaluated at each fluorimetric measurement. Concentrations of RB were calculated by using the corresponding standard curve values. In addition, we did not observed any modification of RB fluorescence in the presence of verapamil in the efflux medium (data not shown).

It is obvious that the more the loading period lasts long, the more the mussels accumulate the fluorescent dye, until the passive diffusion reaches its equi-

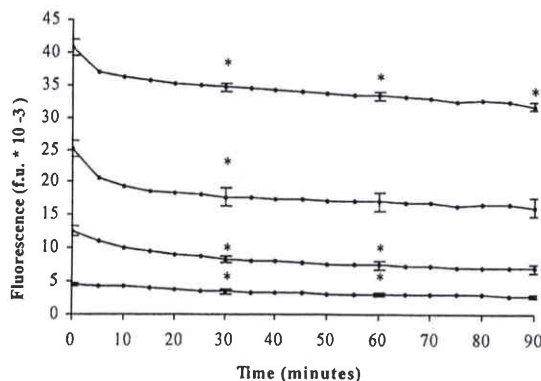


Fig. 3. Stability of rhodamine B (RB). Hundred microliters (100  $\mu$ L) of four RB solutions (0.5, 1, 1.5 and 1.8  $\mu$ M) were transferred to a 96-well microplate. The fluorescence of each sample was then measured every 5 min. S.D. were calculated only at 0, 30, 60 and 90 min. Results are the means and S.D. of 8 measures. \* The result obtained at *t* is significantly lower than that obtained at *t*-30 min (Student test; *p* < 0.05).

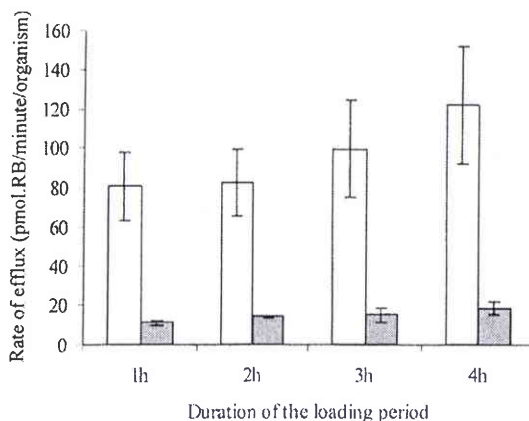


Fig. 4. Influence of the loading period on RB efflux. Twelve groups of 5 mussels were loaded with RB 5  $\mu$ M during either 1, 2, 3 or 4 h (3 groups per duration) and then washed with dechlorinated water. Efflux was performed either in dechlorinated water ( $\square$ ) or in 30  $\mu$ M verapamil ( $\blacksquare$ ). The rates of RB efflux measured after 1, 2, 3 and 4 h are expressed in picomoles of effluxed RB per minute and per organism. Data are means and S.D. of 3 values. Results are representative of three experiments.

brium. In consequence, the response of MXDM activity must be amplified with a high accumulation of RB into the gill cells during the loading period. The MXDM activity measurement protocol first proposed by Smítal and Kurelec (1997) recommended a loading period of 1 h. Our results showed an increasing gradient of MXDM response correlated with the duration of the loading period (Fig. 4). The highest response was obtained after 4 h, suggesting that the equilibrium of passive diffusion was not yet reached after a loading period of 3 h. We did not test any longer loading period because it would probably increase too much the non specific adsorp-

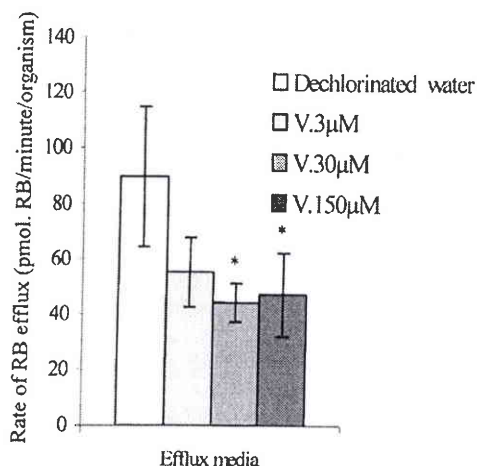


Fig. 5. Inhibitory effect of verapamil on rhodamine B (RB) efflux. Four groups of 5 mussels were loaded with RB during 4 h, and then washed with dechlorinated water. The efflux step was performed either in dechlorinated water or verapamil at 3, 30 and 150  $\mu$ M (V.3  $\mu$ M, V.30  $\mu$ M, V.150  $\mu$ M). The results are the means and S.D. of four experiments performed with the same groups of mussels. \* The results obtained with verapamil are significantly lower than that obtained with dechlorinated water.

tion of the dye on materials and shells, and it would make the experiment too long. According to these results, we decided to use a loading period of 4 h.

The evaluation of specific MXDM activity is based on the sensibility of these mechanisms to verapamil. As shown in Fig. 5, a significant effect appeared when the efflux medium is supplied with 30  $\mu$ M of verapamil. No more effects are observed with 150  $\mu$ M of verapamil. These results are in accordance with those previously described by Smital and Kurelec (1997). Routinely, we decided to use a verapamil concentration of 30  $\mu$ M.

#### *In situ* experiment

The objective of our researches is the development of biomarkers which could be used for *in situ* experiments. Our first goal was to demonstrate that a significant modification of MXDM associated ATPase and MXDM efflux activities could be observed at least in high polluted conditions. In this way, depurated organisms were implanted for 21 days in the TON river downstream of a chlorine bleached pulp and paper mill effluent. The presence of organo-halogenated compounds at this site was estimated to more than 200  $\mu$ g of organically bound chlorine per liter.

The results suggest an increased level of both ATPase and efflux activities. In the first case, the increase is of low order and the difference in comparison to the activity measured before the implantation is not significant (Fig. 6). Concerning the MXDM efflux activity, the increase is highly significant and the level is 4.5 fold higher after

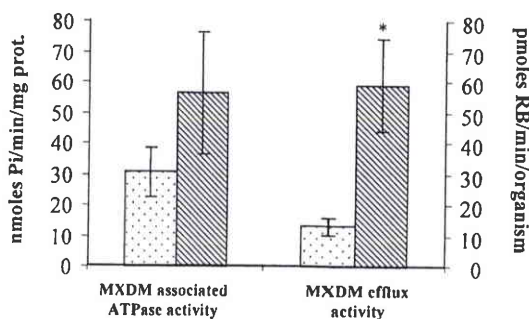


Fig. 6. Variations of MXDM associated ATPase and efflux activities. Activities were measured before (□) and after (▨) the implantation of organisms in a high polluted site. Each measurement is in triplicate. Data are means  $\pm$  S.D. of 3 values. \* Indicate a significant difference between the activity before and after implantation (Student test,  $p < 0.05$ ). Results are representative of three experiments.

implantation (Fig. 6). Moreover, if organisms are conserved in laboratory conditions for 12 days after the measurement of the MXDM activity, the level of MXDM efflux activity decreased and reached the same order as that of the original depurated organisms (data not shown).

#### DISCUSSION-CONCLUSIONS

Recently, several reports suggested the possible use of MXDM activity as a biomarker for the monitoring of aquatic pollution by organic compounds (Kurelec, 1995; Galgani *et al.*, 1996; Kurelec *et al.*, 1996; Smital and Kurelec, 1998). These studies have been notably developed in marine organisms such as *Mytilus galloprovincialis* (Kurelec and Pivcevic, 1991) or *Mytilus edulis* (Minier *et al.*, 1993). For more than 15 years, our laboratory investigated the use of a freshwater bivalve (*Dreissena polymorpha*) as a bioindicator organism. In this way, morphological, physiological and histological researches have been optimized (Leglize and Crochard, 1987; Mouabad and Pihan, 1992; Giamberini and Pihan, 1997). In order to improve this approach, we decided to enlarge our studies by developing the use of biochemical tools. We focussed on MXDM activity because it is described to give global information on the detoxication capacity of organisms (Kurelec, 1997). This point is very interesting in the case of field studies, because water pollution is typically caused by complex mixture of chemicals.

During the optimization of the efflux method, we observed a variation of RB fluorescence. As previously described (Ma and Yao, 1999), this problem is certainly due to sensibility of this dye to natural light. In our method, the efflux step is one hour long with measurements of RB fluorescence every five minutes. Moreover, the protocol does not allow to work in total light-protected conditions. We estimated the decrease in RB fluorescence at more than 20% after 1 h under natural light exposition. There-



fore, in order to avoid errors in the calculation of RB concentrations, it is better to read the fluorescence of standard RB concentrations at each measurement. It is surprising that this phenomenon is not considered by many researchers.

In this study, we have shown that the measurement of MXDM activity in *Dreissena polymorpha* could be achieved both by an indirect (MXDM associated ATPase activity) or a direct (MXDM efflux activity) method. Concerning the measurement of MXDM associated ATPase activity, the high background level of ATPase activities in the cellular medium and the variations of spontaneous hydrolysis of ATP make the test uncertain. Due to the same reasons, we regularly observed important standard deviations, which prevent significant results. Moreover, the induction of this activity after stringent conditions, i.e. the implantation of organisms in a highly polluted river site, is not significant. Then, even if the test has been shown to be reproducible, we think (1) that this method could not be used as a unique test for the evaluation of MXDM activity and (2) that this activity is not sensitive enough for field studies.

Concerning the measurement of MXDM efflux activity, the results were more promising. Actually, the protocol allows several measurements on the same group of organisms. Then the comparison of MXDM activity before and after treatments is more precise. MXDM efflux activity in depurated organisms represents more than 40% of the global signal. If induced, this activity could reach up to 60% of the global signal. This point ensures a low influence of non specific efflux on the results and allows low standard deviations. Moreover, a significant and consequent (4.5 fold) increasing of MXDM efflux activity is observed after an implantation of organisms on a highly polluted site for 21 days. This observation suggests that this activity is sensitive to the presence of organic compounds in the water. Finally, our results are regularly in accordance with the observations previously described by Smital and Kurelec (1998), suggesting an homogeneity of MXDM activity in bivalves. For all these reasons we think that this activity could be an interesting one for the monitoring of freshwater pollution by organic compounds.

**Acknowledgements**—This research was supported in part by a fellowship from the Ministère de la Recherche et de la Technologie (MRT).

## REFERENCES

- Bard S. M. (2000) Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* **48**(4), 357–389.
- Baykov A., Evtushenko O. and Avaeva S. (1988) A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Anal. Biochem.* **171**, 266–270.
- Borst P. and Schinkel A. (1997) Genetic dissection of the function of mammalian P-glycoproteins. *TIG.* **13**(6), 217–222.
- DIN (Deutsches Institut für Normung e.V.) (1985) Bestimmung des adsorbierbaren, organisch gebundenen Halogens (AOX). DIN 38 409, Teil 14, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Beuth Verlag, Berlin, 11 s.
- Doppenschmitt S., Langguth P., Regardh C. G., Andersson T. B., Hilgendorf C. and Spahnlangguth H. (1999) Characterization of binding properties to human P-glycoprotein: Development of a [<sup>3</sup>H] verapamil radioligand-binding assay. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **288**(1), 348–357.
- Epel D. (1998) Use of multidrug transporters as a first line defense against toxins in aquatic organisms. *Comp. Biochem. Physiol.* **120A**, 23–28.
- Galgani F., Cornwall R., Toomey B. and Epel D. (1996) Interaction of environmental xenobiotics with a multixenobiotic defense mechanism in the bay mussel *Mytilus galloprovincialis* from the coast of California. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**(3), 325–331.
- Germann U. A. and Chambers T. C. (1998) Molecular analysis of the multidrug transporter, P-glycoprotein. *Cytotechnology* **27**(1–3), 31–60.
- Giamberini L. and Pihan J. -C. (1997) Lysosomal changes in the hemocytes of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* experimentally exposed to lead and zinc. *Dis. Aquat. Org.* **28**, 221–227.
- Hayer F., Wagner P. and Pihan J. -C. (1996) Monitoring of extractable organic halogens (EOX) in chlorine bleached pulp and paper mill effluents using four species of transplanted aquatic mollusks. *Chemosphere* **33**(11), 2321–2334.
- Hooijberg J., Broxterman H., Heijn M., Fles D. L. A., Lankelma J. and Pinedo H. (1997) Modulation by (iso)flavonoids of the ATPase activity of the multidrug resistance protein. *FEBS Lett.* **413**, 344–348.
- Juliano R. L. and Ling V. (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants. *Biochem. Biophys. Acta.* **455**, 152–162.
- Kurelec B. (1995) Inhibition of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms: ecotoxic consequences. *Sci. Total Environ.* **171**, 197–204.
- Kurelec B. (1997) A new type of hazardous chemical: the chemosensitizers of multixenobiotic resistance. *Environ. Health Perspect.* **105**(Suppl. 4), 855–860.
- Kurelec B. and Pivcevic B. (1991) Evidence for a multixenobiotic resistance mechanism in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* **19**, 291–302.
- Kurelec B., Krca C. and Lucic D. (1996) Expression of multixenobiotic resistance mechanism in a marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of exposure to polluted environments. *Comp. Biochem. Physiol.* **113C**(2), 283–289.
- Lanzetta P., Alvarez L., Reinach P. and Candia O. (1979) An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal. Biochem.* **100**, 95–97.
- Leglize L. and Crochard C. (1987) Vérification expérimentale du choix de *Dreissena polymorpha* Pallas (lamelli-branches) comme bioindicateur de pollution métallique. *Nat. Can. (Rév. Ecol. Syst.)* **114**, 315–323.
- Lowry O. J., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagents. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.
- Ma Y. and Yao J. N. (1999) Comparison of photodegradative rate of rhodamine B assisted by two kinds of TiO<sub>2</sub> films. *Chemosphere* **38**(10), 2407–2414.
- Minier C., Akcha F. and Galgani F. (1993) P-glycoprotein expression in *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* in polluted seawater. *Comp. Biochem. Physiol.* **106B**, 1029–1036.

- Mouabad A. and Pihan J. C. (1992) The pumping behavior response of *Dreissena polymorpha* to pollutants. A method for toxicity screening. In *The Zebra Mussel Dreissena polymorpha*, *Limnologie Aktuell*, Vol. 4, eds D. Neumann and H. A. Jenner, pp. 147–154. Gustav Fisher Verlag Stuttgart-Jena-New-York.
- Parant M. (1998) Xenobiotic metabolism in bivalves. *CRAS Sér. III—Life Sci.* **321**(6), 485–494.
- Schinkel A. H. (1997) The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Seminars Cancer Biol.* **8**(3), 161–170.
- Smital T. and Kurelec B. (1997) Inhibitors of the multi-xenobiotic resistance mechanism in natural waters: in vivo demonstration of their effects. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**(10), 2164–2170.
- Smital T. and Kurelec B. (1998) The activity of multi-xenobiotic resistance mechanism determined by rhodamine B-efflux method as a biomarker of exposure. *Mar. Environ. Res.* **46**(1–5), 443–447.
- Ueda K., Yoshida A. and Amachi T. (1999) Recent progress in P-glycoprotein research. *Anti Cancer Drug Des.* **14**(2), 115–121.



PERGAMON

Chemosphere 52 (2003) 1105–1113

www.elsevier.com/locate/chemosphere

CHEMOSPHERE

# Response of multixenobiotic defence mechanism in *Dreissena polymorpha* exposed to environmental stress

Sandrine Pain \*, Marc Parant \*

Université de METZ, UFR Sci-FA, Laboratoire ESE, CNRS FRE 2635, Campus Bridoux,  
Avenue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

Received 16 October 2002; received in revised form 28 February 2003; accepted 23 March 2003

## Abstract

Multixenobiotic defence mechanism (MXDM) has been recently described as a first line defence system in many aquatic organisms and it has raised attention for its potential as an early biomarker of exposure to environmental stress. In order to investigate the relevance of this biomarker in the freshwater zebra mussel *Dreissena polymorpha*, we examined its response to exposure and to cessation of exposure. For this purpose, depurated zebra mussels were transplanted to natural rivers or exposed to medium experimentally contaminated with fuel oil 2 in the laboratory. After the exposure period, mussels were submitted to depuration in clean water in the laboratory. The level of MXDM activity was assessed by the efflux method that allows a simple and fast measure of the rate of rhodamine B efflux. MXDM activity was induced following exposure and induction appears earlier after laboratory exposure (3 days) than after in the field exposure (3–14 days). The level of MXDM response could not be directly correlated to exposure dose in the laboratory and to isolated physicochemical parameters or AOX levels in the field. The behaviour of MXDM activity seems to reflect the occurrence of exposure to a global stress rather than to specific compounds. Our results highlighted the possibility to monitor MXDM response in the freshwater zebra mussel. In spite of the difficulty to interpret responses resulting from the lack of specificity of response, multixenobiotic defence mechanism displays qualities to represent a biomarker of general stress in freshwater ecosystems.

© 2003 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** MXDM; MXRM; Biomarker; *Dreissena polymorpha*; Organic contamination; Field studies

## 1. Introduction

Multixenobiotic defence mechanism (MXDM), also known as Multixenobiotic resistance mechanism (MXRM; Kurelec and Pivcevic, 1989), acts as a first line defence system against organic compounds in aquatic organisms. The initial function of such mechanism was probably to protect organisms from natural toxins. It may have evolved and adapted to new man-made compounds that organisms have to handle in their nat-

ural environment (Kurelec, 1992, 1995a, 1997; Epel, 1998). MXDM has been associated with the expression of a membrane glycoprotein called P-glycoprotein- or P170-like with reference to the multidrug transporter identified in mammals (Juliano and Ling, 1976). This mechanism mediates ATP-dependent efflux of a wide variety of structurally and functionally diverse compounds, provided that they are moderately hydrophobic (Endicott and Ling, 1989; Gottesman and Pastan, 1993). Such efflux mechanism has been identified in many aquatic organisms such as sponges (Kurelec et al., 1992), worms (Toomey and Epel, 1993), amphibians (Bonfanti et al., 1998) or fish (Chan et al., 1992). Bivalve molluscs have been searched for an analogous efflux mechanism and elements attesting presence of MXDM have been

\* Corresponding authors. Tel.: +33-3-8737-8413/8417.

E-mail addresses: sandrine.pain@univ-metz.fr (S. Pain), parant@sciences.univ-metz.fr (M. Parant).

found in marine (*Mytilus edulis*, *Crassostrea gigas*, Minier et al., 1993; *M. galloprovincialis*, Kurelec and Pivcevic, 1991) as well as in freshwater (*Anodonta cygnea*, Kurelec and Pivcevic, 1989; *Corbicula fluminea*, Waldmann et al., 1995; *Dreissena polymorpha*, Smital and Kurelec, 1997) organisms. MXDM in bivalves has been shown to confer effective protection against deleterious effects caused by the exposure to toxic compounds (Waldmann et al., 1995; McFadzen et al., 2000). This defence system has also been shown to be induced in bivalves collected from polluted areas (Minier et al., 1993; Kurelec et al., 1996a) and following in the field or laboratory exposures (Smital and Kurelec, 1998; Eufemia and Epel, 2000). For these reasons, MXDM in bivalves has raised attention for its potentialities as a biomarker (Minier et al., 1999; Kurelec et al., 2000; Livingstone et al., 2000).

The aim of our research is to develop the use of MXDM as a biomarker of exposure to environmental stress in the freshwater zebra mussel *Dreissena polymorpha*. For this purpose, a method for the measurement of MXDM activity has been recently proposed. It is called “efflux method” and is based on determination of the capabilities of living mussels’ gill cells to efflux a fluorescent dye in the presence and absence of a specific inhibitor (Smital and Kurelec, 1997; Parant and Pain, 2001). Our previous works showed that MXDM was induced when mussels were exposed to natural water heavily contaminated (Parant and Pain, 2001).

In this context, the aim of the present work was to study the potentialities of MXDM in situ response as a biomarker and to contribute to a better understanding of the real significance of this response. For this purpose, in situ experiments are described, which consisted in transplanting specimens of zebra mussels in natural waters upstream and downstream of industrial effluents. MXDM activity was measured after different exposure duration. In addition, water samples were collected for physicochemical analyses and AOX (adsorbable organic compounds) determination. The results obtained from in the field studies were supported with those of a laboratory experiment during which mussels were exposed to a chemical mix, fuel oil 2. The response of MXDM to cessation of exposure was also investigated.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Organisms

*Dreissena polymorpha* ( $20 \pm 2$  mm in shell length) were collected in the Moselle river (METZ, France). Organisms were carried to the laboratory in the water of origin. They were kept under laboratory conditions for 3 days (in situ experiments) or 8 days (laboratory experiment) prior to experiments, i.e. dechlorinated water

(in situ experiments) or mineral water (laboratory experiment) with continuous oxygen. The medium ( $16\text{--}17^\circ\text{C}$ ) was changed every two days and mussels were fed daily with commercial frozen food (Nauplium). After 3–8 days under laboratory conditions, MXDM activity decreased to a basal level and organisms were called depurated organisms (Smital et al., 2000).

### 2.2. In situ experiments

The baseline level of MXDM activity in depurated organisms was measured by the efflux method using rhodamine B after 3 days under laboratory conditions. Mussels were then transplanted in nets to the studied sites, either upstream or downstream of industrial effluents.

#### 2.2.1. Nuclear plant effluent

A nuclear plant effluent in the Meuse river (CHOOZ, France) was studied. This river is continually monitored for water quality by a French governmental agency (Banque de l'Eau Rhin-Meuse). In the studied portion of the Meuse river, water quality was good over the past ten years according to French criteria for the assessment of river water quality. During our experiment, the plant was treated with chloramine to clean up the canalisation. Because its effluent was liable to contain or to form organo-halogenated compounds, we measured AOX levels at the studied sites. Mussels (collected in July 1999) were transplanted to one site upstream (0.5 km) and two sites downstream (3 and 6 km) of the effluent. After 28 days, organisms were collected from the three sites and carried to the laboratory in water of origin. For efflux measurement, organisms were kept in water of origin with continuous oxygen prior to analysis.

#### 2.2.2. Chlorine bleached pulp and paper mill effluent

A chlorine bleached pulp and paper mill effluent in the Ton river (ECOUVIEZ, France) was studied. Mussels (collected in April 2000) were transplanted 3 km upstream and 5 km downstream of the effluent. The latter site is a highly injured site according to the results of a chemical monitoring of its water performed by the French “Banque de l'eau Rhin-Meuse”. In addition, it has been previously shown to be a highly polluted site due to the presence of organo-halogenated compounds (AOX) whereas the site upstream displayed low AOX levels (Hayer and Pihan, 1996; Hayer et al., 1996). After 3, 14 and 21 days of exposure in this river, mussels were collected from the two sites and carried to the laboratory in water of origin. For efflux measurement, organisms were kept in water of origin with continuous oxygen prior to analysis.

The mussels used for efflux measurement at day 21 were replaced in dechlorinated water for 12 days and the

levels of MXDM activity were measured after 8 and 12 days of depuration.

### 2.2.3. Water sampling and analysis

Water samples for physicochemical analysis were collected at all the monitoring sites at each date of the two in situ experiments. Temperatures were directly measured in the field. Physicochemical data are interpreted according to French criteria for the assessment of river water quality (BERM—<http://www.eau-rhin-meuse.fr/BERM/HTM/default.htm>). AOX determination was performed by IRH-Environment (NANCY, France) following the method NF EN 1485. Other analysis were performed by our laboratory.

### 2.3. Laboratory experiment

The level of MXDM activity was measured by the efflux method using rhodamine B immediately after collection (in September 2001) of organisms (the next day) and after 8 days under laboratory conditions (medium changed every two days) in order to check the decrease of MXDM activity (Smital et al., 2000). Mussels were then exposed to 450 ml fuel oil 2 at 0.1 or 10  $\mu\text{g/l}$ , or to mineral water (Crystalline; spring “Vosgia”, METZERL, France) with continuous oxygen. Three groups of five mussels were used for each condition. The level of MXDM was measured after 3 and 8 days of exposure. The exposure medium was changed after 4 days. After the exposure period mussels were maintained in mineral water and the level of MXDM activity was checked after a 8 day depuration.

### 2.4. Efflux method

The MXDM activity was measured using the efflux method. This method was previously adapted and optimised from a protocol developed by Smital and Kurelec (1997) (Parant and Pain, 2001). Briefly, the principle of efflux method was first to expose mussels to a fluorescent dye, rhodamine B, and second, to measure the rate of efflux of previously accumulated dye. Groups of five mussels were placed in a light-protected beaker and exposed to dechlorinated water containing 5  $\mu\text{M}$  of rhodamine B (RB) (150 ml for one group of mussels) for a period of 4 h. After the loading period, mussels were washed threetimes in dechlorinated water (150 ml for one group of mussels) for 2 min. The last step was achieved by exposing organisms either in 30 ml of dechlorinated water or in 30 ml of the same medium containing 30  $\mu\text{M}$  of verapamil. Every 5 min, 100  $\mu\text{l}$  of each medium were transferred in duplicate to a 96-well microplate and the fluorescence of effluxed RB was immediately measured on a Fluostar (BMG Lab Technologies). Results were plotted and the rate of RB efflux was then calculated from the linear part of the curve.

The activity of MXDM is estimated by the difference between the efflux rates obtained in the absence and in the presence of verapamil during the efflux step.

### 2.5. Statistical analysis

All data are presented as mean  $\pm$  SD. Mean values were calculated from the results obtained for three groups of five mussels. Differences between the activities measured at each site and date were tested by Student *t* test ( $p < 0.05$ ).

## 3. Results

### 3.1. In situ experiments

#### 3.1.1. Nuclear plant effluent

During the first experiment, we studied the in situ response of MXDM activity in organisms transplanted upstream and downstream of a nuclear plant effluent. Analysis of water sampled at the three sites showed that the physicochemical parameters were not affected by the effluent release (Table 1). The concentrations of total phosphorus, suspended matter and phytoplankton were similar at all the sites. The concentrations of nitrates and biological oxygen demand measured upstream were higher than those measured downstream. The pH decreased by 0.5 pH units between the two dates at all the sites. All other parameters remained the same at the two dates. The plant did neither provoked an elevation of water temperature nor an elevation of AOX levels downstream of the effluent (Table 1).

The initial level of MXDM activity measured before transplantation of mussels in the river was about 13 pmol of effluxed RB per min and per organism (pmol.RB/min/organism; Fig. 1). After a 28 day in situ exposure, the activity was significantly increased at the three sites (39, 80 and 44 pmol.RB/min/organism for the sites 1, 2 and 3 respectively). A threefold induction is observed at the sites 1 (upstream) and 3 (6 km downstream). We measured a sixfold induction at the site 2 which was the nearest site downstream of the nuclear plant effluent (Fig. 1). The measured responses were neither correlated with the AOX levels, nor with isolated physicochemical parameters.

#### 3.1.2. Chlorine bleached pulp and paper mill effluent

For the second experiment, mussels were transplanted for 3, 14 and 21 days upstream and downstream of a chlorine bleached pulp and paper mill effluent. Physicochemical data showed that some parameters are seriously affected by the effluent release (Table 2). The temperature of water was increased by 2.4–3.8  $^{\circ}\text{C}$  between the sites 1 and 2. Water conductivity also increased between these two sites, due to an increase of

Table 1

Physicochemical characteristics of the water collected upstream (site 1) and downstream (sites 2 and 3) of the nuclear plant effluent

Parameters	Units	Site 1		Site 2		Site 3	
		D0	D28	D0	D28	D0	D28
AOX	µg/l	11.2	7.7	10.9	12.9	11.3	10.3
T	°C	19	18.8	20	19.1	19.5	19.3
δT	°C	—	—	1	0.3	0.5	0.5
pH		8.32	7.8	8.33	7.84	8.32	7.8
Conductivity 20 °C	µS/cm	464	450	464	452	470	457
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	mg N/l	0.056	0.047	0.090	0.045	0.045	0.039
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	mg N/l	0.018	0.014	0.017	0.013	0.009	0.009
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	mg N/l	6.69	6.24	6.66	1.30	1.32	1.35
N (Kjeldhal)	mg N/l	0.699	0.670	0.840	0.687	0.491	0.485
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	mg P/l	0.033	0.046	0.042	0.033	0.048	0.048
P (total)	mg P/l	0.150	0.145	0.141	0.158	0.128	0.158
Cl <sup>-</sup>	mg/l	18.4	17.4	18.3	18.2	18	18.2
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	mg/l	37.4	38.2	49.3	39.9	40.1	44
Ca <sup>2+</sup>	mg/l	71.8	71.8	74.35	71.5	73.9	73.1
Mg <sup>2+</sup>	mg/l	4.32	4.43	4.47	4.57	4.64	4.8
Na <sup>+</sup>	mg/l	11.95	13.6	14.1	13.1	12.9	13.4
K <sup>+</sup>	mg/l	3.28	2.94	3.07	3.17	3.14	3.25
COD	mg/l	16.19	15.87	23.00	15.06	14.43	14.43
BOD(5)	mg/l	3.8	3.5	2.84	2.4	2.1	2.3
Suspended matter	mg/l	10.29	13.14	13.00	13.71	13.29	15.29
Chlorophyllous pigments	µg/l	32.99	37.38	34.76	43.45	43.73	30.09

Physicochemical parameters were measured at the beginning (D0) and at the end (D28) of the experiment, δT corresponds to the difference between the temperature of water measured downstream and upstream of the effluent.

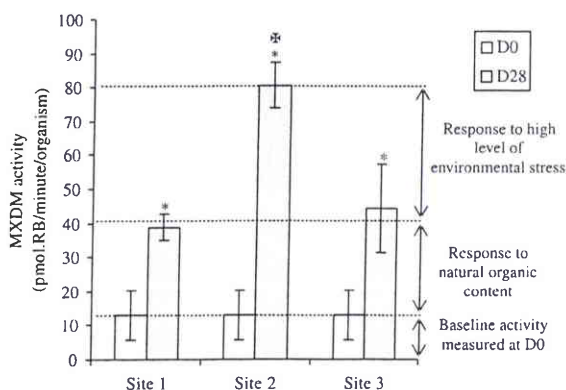


Fig. 1. Response of MXDM activity in *Dreissena polymorpha* after exposure upstream (site 1) and downstream (sites 2 and 3) of a nuclear plant effluent. Measurements were performed before translocation (D0) and after a 28 day exposure (D28). Data are means  $\pm$  SD of results obtained from three measurements. Statistical analysis was performed by Student *t* test. (\*) indicates significant difference between dates at each site ( $p < 0.05$ ). (✱) indicates significant difference between sites at D28 ( $p < 0.05$ ).

minerals (especially Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup> and SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>). The AOX concentrations were very low at the site 1 and inversely very high at the site 2. However perturbations also occurred upstream of the effluent. Some parameters, such

as nitrogen, total phosphorus, suspended matter, and chlorophyll indeed displayed higher values at the site 1 than at the site 2, especially at the beginning of the experiment. Chemical and biological oxygen demands decreased at the site 1 between the beginning and the end of the experiment, whereas they increased at the site 2. The pH measured at the site 1 decreased by 0.4 pH units between the two dates (Table 2). Finally, interpretation of these data according to French standards allows to conclude that the site upstream of the effluent release is as degraded as the site downstream (except for AOX and temperature).

The initial level of MXDM activity measured before translocation of mussels in the river was about 30 pmol.RB/min/organism (Fig. 2). The results did not show any effect after a 3 days exposure, but a two to threefold induction of the MXDM activity was measured after 14 days both upstream and downstream of the studied effluent (respectively 60 and 80 pmol.RB/min/organism). Between 14 and 21 days of in situ exposure, the activity measured at the site 1 showed a twofold induction (120 pmol.RB/min/organism). The activity measured in organisms transplanted at the site 2 during a 21 day exposure remained the same as that measured after 14 days. However, no significant difference in activity was observed between the two sites ( $p = 0.066$ ). Finally, MXDM activity in *Dreissena polymorpha* transplanted upstream and downstream of

Table 2

Physicochemical characteristics of the water collected upstream (site 1) and downstream (site 2) of the chlorine bleached pulp and paper mill effluent

Parameters	Units	Site 1				Site 2			
		D0	D3	D14	D21	D0	D3	D14	D21
AOX	µg/l	17	<10	19	<10	136	141	129	125
T	°C	9	8.3	11.8	13	11.4	11.4	15.2	16.8
δT	°C	—	—	—	—	2.4	3.1	3.4	3.8
pH		8.2	—	—	7.8	8	—	—	7.9
Conductivity 20 °C	µS/cm	367	—	—	395	577	—	—	570
O <sub>2</sub>	mg/l	9.63	10.11	9.75	9.1	9.8	9.37	8.37	8.03
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	mg N/l	0.148	—	—	0.195	0.101	—	—	0.174
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	mg N/l	0.031	—	—	0.049	0.029	—	—	0.049
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	mg N/l	1.304	—	—	1.600	1.449	—	—	1.059
N (Kjeldhal)	mg N/l	3.594	—	—	1.010	1.272	—	—	0.730
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	mg P/l	0.062	—	—	0.070	0.053	—	—	0.057
P (total)	mg P/l	0.356	—	—	0.273	0.189	—	—	0.220
Cl <sup>-</sup>	mg/l	9	—	—	9.5	26.3	—	—	27.8
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	mg/l	20.4	—	—	23.7	92.7	—	—	87
Ca <sup>2+</sup>	mg/l	71.5	—	—	77.7	88.7	—	—	87.7
Mg <sup>2+</sup>	mg/l	3.78	—	—	3.7	4.03	—	—	3.7
Na <sup>+</sup>	mg/l	6.38	—	—	6.37	41	—	—	43.1
K <sup>+</sup>	mg/l	2.59	—	—	1.98	5.64	—	—	4.98
COD	mg/l	19.37	—	—	14.13	18.75	—	—	23.28
BOD(5)	mg/l	6.88	—	—	5.94	4.64	—	—	5.31
Suspended matter	mg/l	86.6	—	—	39.4	48.9	—	—	39
Chlorophyllous pigments	µg/l	30.84	—	—	17.01	13.46	—	—	13.08

AOX levels, temperature and dissolved oxygen were measured at the four dates of the experiment, D0, D3, D14 and D21; all other parameters were measured only at D0 and at D21; δT corresponds to the difference between the temperature of water measured downstream and upstream of the effluent.

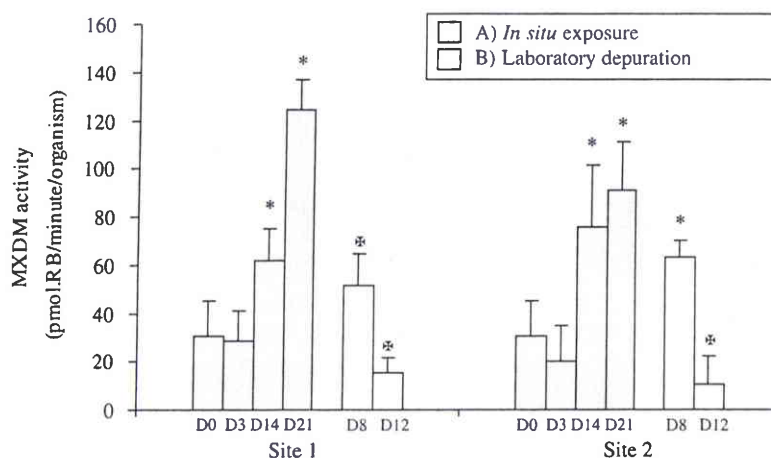


Fig. 2. Response of MXDM activity in *Dreissena polymorpha* (A) after exposure upstream (site 1) and downstream (site 2) of a chlorine bleached pulp and paper mill effluent. Measurements were performed before transplantation (D0) and after 3, 14 and 21 days of in situ exposure (D3, D14 and D21). After the exposure period, mussels were placed in dechlorinated water (B) and measurements were performed after 8 and 12 days of depuration (D8 and D12). Data are means  $\pm$  SD of results obtained from three measurements. Statistical analysis was performed with Student *t* test. (\*) indicates a significant induction in comparison with the activity measured at D0 ( $p < 0.02$ ). (✱) indicates a significant depuration in comparison with the activity measured at D21 ( $p < 0.04$ ).

the effluent reached a similar level after a 21 day exposure. Interpretation of physicochemical data showed

that the two studied sites are degraded and display elevated levels of organic matter. In addition, the site



located downstream displays elevated levels of AOX and high temperature due to the effluent release, which is consistent with previous studies (Hayer and Pihan, 1996; Hayer et al., 1996). The increase in temperature could not explained the induction measured in transplanted zebra mussels at the two sites. As well as for the previously described experiment, the induction was not related to AOX levels.

After the in situ exposure, the mussels were replaced in dechlorinated water in order to observe the behaviour of the MXDM activity when the exposure stops. After 12 days the level of the activity measured in the mussels previously exposed to water of either the site 1 or the site 2, returned back to a baseline level, similar to that measured before transplantation (Fig. 2).

### 3.2. Laboratory experiment

The aim of the laboratory experiment was to study how MXDM behaves in the case of theoretical pollution, namely, in controlled conditions.

Before the exposure period, organisms were maintained in dechlorinated water for 8 days. MXDM activity reached its basal level during this depuration period. Results indeed showed a decrease of MXDM activity after 8 days that reached 4.34 pmol.RB/min/organism. MXDM activity was slightly increased after a 3 days exposure to 0.1 µg/l of fuel oil 2. Though not significant, this increase was maintained after 8 days (Fig. 3). In contrast, a significant fourfold increase was

measured when mussels were exposed for 3 days to 10 µg/l of fuel oil 2. However, MXDM activity measured after 8 days showed a marked decrease and reached the same level as that measured for the lower dose (Fig. 3). Except for the higher dose, the results obtained at D8 display a high variability.

After the exposure period, the same mussels were maintained in mineral water for 8 days. The MXDM activity measured after this depuration period was the same as that measured before the exposure period (data not shown).

## 4. Discussion

### 4.1. Induction of MXDM activity

MXDM activity assessed in *Dreissena polymorpha* by the efflux method was induced following laboratory and in the field exposures. As it is currently difficult to find a control site for in situ experiments, MXDM activity measured after in situ exposure was compared with its basal level assessed after a laboratory depuration (Smital et al., 2000). Basal levels measured in the described experiments are in the range of those assessed during a 3 years period in the population of zebra mussels used (unpublished data).

During laboratory exposure to fuel oil 2, it was possible to measure a highly significant induction of MXDM activity after 3 days. This result is in accordance with those of previous studies conducted in other bivalve species showing induction within 1–3 days (Kurelec et al., 1996b; Smital and Kurelec, 1998; Eufemia and Epel, 2000). In contrast, induction appeared later following in the field exposure (between 3 and 14 days) but the response was maintained and/or increased up to 21 and 28 days. Other works reported earlier responses following in the field exposure (3–4 days) but these experiments were not pursued any longer (Kurelec, 1995b; Smital and Kurelec, 1998). In contrast, the transplantation of *Crassostrea gigas* for 30 days to polluted sites did not result in induction of MXDM protein expression (Ringwood et al., 1999). Comparisons of these data suggest that the time to MXDM induction might depend on species, exposure conditions and methods of evaluation. Our findings suggest that time to induction may be shortened when the level of substrates and/or the stress generated by exposure is high, as it was the case during laboratory exposure to fuel oil 2.

In this work we measured physicochemical parameters indicating water quality and we chose the AOX parameter as a reference to assess the level of organic pollution at the studied sites. Our results showed that there were no direct relation between the measured responses in *Dreissena polymorpha* and the AOX con-

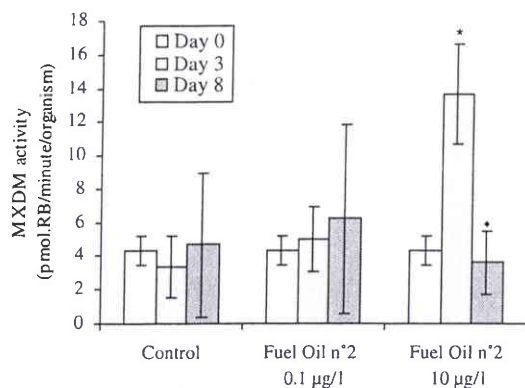


Fig. 3. Response of MXDM activity in *Dreissena polymorpha* after 3 and 8 days (D3, D8) of exposure to 0.1 or 10 µg/l of fuel oil 2. Data are means  $\pm$  SD of results obtained from three measurements. Statistical analysis was performed with Student *t* test. (\*) indicates that the activity measured after 3 days of exposure to 10 µg/l is significantly different from that measured at D0 ( $p = 0.0065$ ), and from that measured after 3 days of exposure to control medium ( $p = 0.0069$ ) and to 0.1 µg/l of fuel oil 2 ( $p = 0.013$ ). (♦) indicates that the activity measured after 8 days of exposure to 10 µg/l is significantly different from that measured at D3 ( $p = 0.0079$ ).



tamination level. Kurelec and co-workers have already encountered such results. Although they succeeded once in establishing a direct relation between the induction measured in a marine mussel *Mytilus galloprovincialis* and the contamination levels of the sites (Kurelec et al., 1996a), most of their results did not demonstrate the existence of a correlation (Kurelec et al., 1998). Other examples are also reported, which showed no direct relation between MXDM activity or protein expression level and the studied contamination (Minier et al., 2000; Doi et al., 2001; Keppler and Ringwood, 2001). During exposure of zebra mussels to fuel oil 2, the response measured after 3 days was related to the exposure concentration. However, this relation was not maintained after 8 days. MXDM activity indeed showed a marked decrease at 10 µg/l, probably because of a high stress at this exposure duration, as suggested by an increase in variability. Although laboratory experiments enable to correlate more easily response to exposure, it remains difficult to determine whether the measured induction is caused by the presence of substrates compounds at specific concentrations or by the stress generated by the exposure.

These findings and those of previously cited researchers have failed to establish a clear relation between induction of MXDM system and exposure. This could be explained by the low specificity of MXDM that has been shown to be induced in response to exposure to substrates and non-substrates compounds as well as to non-specific stress such as heat shock (Eufemia and Epel, 2000). In addition, numerous compounds (natural or anthropogenic) have been identified as substrates for the MXDM system (Cornwall et al., 1995; Galgani et al., 1996; Toomey et al., 1996; Schröder, 1998; Eufemia et al., 2002). These compounds could also be responsible for the induction of MXDM either directly or indirectly by generating stress. In consequence, the activity measured following exposure is a global response to a combination of compounds and stresses.

When zebra mussels were transplanted from clean water (dechlorinated water) to a natural site whatever its contamination level, we always observed an induction. The occurrence of an induction in organisms exposed to unpolluted water could be attributed to the difference of organic content between dechlorinated water and natural water. Indeed, natural water inevitably contains organic compounds that are likely to be inducers of MXDM. This induction that we named “baseline induction” could correspond to an adaptation process to environmental changes. We observed induction levels higher than baseline induction. Such a response suggests the occurrence of environmental stress. That induction could be due to the presence of elevated levels of organic compounds in the environment is to consider because it occurs in waters heavily contaminated by organic compounds. In addition, the laboratory experiment showed

a high induction level when zebra mussels were exposed to elevated level of organic contaminants. However, whether induction is due to the presence of these organic compounds or to a stress generated by them (or other stressors) has to be determined.

Finally, the induction of MXDM in zebra mussels transplanted in the field may be considered as the sum of at least two elements: (1) baseline induction due to environmental changes and (2) induction in response to the occurrence of an additional stress.

#### 4.2. Reversibility of the induction

Experiments performed in zebra mussels also showed that after cessation of exposure MXDM activity came back to a level equivalent to that measured before exposure. The time needed to reach this basal level was almost equivalent to the time to induction during in the field experiment (12–14 days). In contrast, it was at least twofold longer in the case of laboratory experiment. The decrease of MXDM activity has already been observed in *Mytilus galloprovincialis*, but the measured depuration was more rapid since MXDM activity reached its baseline level within 4 days (Smital and Kurelec, 1998). MXDM induction is then a reversible phenomenon. When the exposure indeed stops, the system of defence is not needed anymore and the activity is maintained at a baseline level. Regarding our findings, it can be suggested that the duration of the depuration process may be related to the intensity of the stress undergone by organisms during exposure.

#### 5. Conclusions

The previously described work shows that the response of MXDM activity assessed by the efflux method in *Dreissena polymorpha* can be monitored during either laboratory or in the field exposure. The response to exposure can be compared to the baseline level measured before exposure and can be detected after 3–14 days of exposure. The measured response was shown to be maintained up to one month during in the field exposure. In addition, it was shown that cessation of exposure caused a decrease of MXDM activity to a baseline level. These findings underline the relevance of MXDM in zebra mussels as an early indicator of stress. However it still remains difficult to interpret MXDM response. Indeed, our results showed that it was induced following pollutant exposure but it was not possible to determine whether the MXDM response was linked to pollution. The current knowledge about MXDM tends towards the idea that its response can be modulated by natural factors such as diet, food availability or temperature (Eufemia and Epel, 2000; Minier et al., 2000; Keppler

and Ringwood, 2001). Future works are then needed to understand the natural variations of MXDM in zebra mussel in order to distinguish between a natural response and a response to environmental stress.

Whether MXDM system assessed in zebra mussel could be used as a biomarker of pollutant exposure remains to be determined. However MXDM could be considered as an early and general biomarker of environmental stress and the great interest of this tool lies in the fact that it enables to detect an unusual activation of the defence system and thus to alert on possible impacts on organisms' health, though it does not give information about the nature of these impacts.

### Acknowledgements

This research was supported in part by a fellowship from the Ministère de la Recherche et de la Technologie and by grants E31/C02755/O, E31/C02756/O, E31/C02757/O, E31/C02758/O from Electricité de France (EDF).

### References

- Bonfanti, P., Colombo, A., Camatini, M., 1998. Identification of a multixenobiotic resistance mechanism in *Xenopus laevis* embryos. *Chemosphere* 37, 2751–2760.
- Chan, K.M., Davies, P.L., Childs, S., Veinot, L., Ling, V., 1992. P-glycoprotein genes in the winter flounder *Pleuronectes americanus*: isolation of two types of genomic clones carrying 3' terminal exons. *Biochim. Biophys. Acta* 1171, 65–72.
- Cornwall, R., Holland Toomey, B., Bard, B., Bacon, C., Jarman, W.M., Epel, D., 1995. Characterization of multixenobiotic/multidrug transport in the gills of the mussel *Mytilus californianus* and identification of environmental substrates. *Aquat. Toxicol.* 31, 277–296.
- Doi, A.M., Holmes, E., Kleinow, K.M., 2001. P-glycoprotein in the catfish intestine: inducibility by xenobiotics and functional properties. *Aquat. Toxicol.* 55, 157–170.
- Endicott, J.A., Ling, V., 1989. The Biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 137–171.
- Epel, D., 1998. Use of multidrug transporters as a first line defense against toxins in aquatic organisms. *Comp. Biochem. Physiol.* 120A, 23–28.
- Eufemia, N.A., Epel, D., 2000. Induction of the multixenobiotic defense mechanism (MXR), P-glycoprotein in the mussel *Mytilus californianus* as a general cellular response to environmental stress. *Aquat. Toxicol.* 49, 89–100.
- Eufemia, N., Clerte, S., Girshick, S., Epel, D., 2002. Algal products as naturally occurring substrates for P-glycoprotein in *Mytilus californianus*. *Mar. Biol.* 140, 343–353.
- Galgani, F., Cornwall, R., Toomey, B., Epel, D., 1996. Interaction of environmental xenobiotics with a multixenobiotic defense mechanism in the bay mussel *Mytilus galloprovincialis* from the coast of California. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 325–331.
- Gottesman, M.M., Pastan, I., 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 385–427.
- Hayer, F., Pihan, J.C., 1996. Accumulation of extractable organic halogens (EOX) by the freshwater mussel *Anodonta cygnea* L. exposed to chlorine bleached pulp and paper mill effluents. *Chemosphere* 32, 791–803.
- Hayer, F., Wagner, P., Pihan, J.-C., 1996. Monitoring of extractable organic halogens (EOX) in chlorine bleached pulp and paper mill effluents using four species of transplanted aquatic molluscs. *Chemosphere* 33, 2321–2334.
- Juliano, R.L., Ling, V., 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* 455, 152–162.
- Keppeler, C.J., Ringwood, A.H., 2001. Expression of P-glycoprotein in the gills of oysters, *Crassostrea virginica*: seasonal and pollutant related effects. *Aquat. Toxicol.* 54, 195–204.
- Kurelec, B., 1992. The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Crit. Rev. Toxicol.* 22, 23–43.
- Kurelec, B., 1995a. Inhibition of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms: ecotoxic consequences. *Sci. Total Environ.* 171, 197–204.
- Kurelec, B., 1995b. Reversion of the multixenobiotic resistance mechanism in gills of a marine mussel *Mytilus galloprovincialis* by a model inhibitor and environmental modulators of P170-glycoprotein. *Aquat. Toxicol.* 33, 93–103.
- Kurelec, B., 1997. A new type of hazardous chemical: the chemosensitizers of multixenobiotic resistance. *Environ. Health Persp.* 105, 855–860.
- Kurelec, B., Pivcevic, B., 1989. Distinct glutathione-dependant enzyme activities and a verapamil-sensitive binding of xenobiotics in a fresh-water mussel *Anodonta cygnea*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 934–940.
- Kurelec, B., Pivcevic, B., 1991. Evidence for a multixenobiotic resistance mechanism in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 19, 291–302.
- Kurelec, B., Krca, C., Lucic, D., 1996a. Expression of multixenobiotic resistance mechanism in a marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of exposure to polluted environments. *Comp. Biochem. Physiol.* 113C, 283–289.
- Kurelec, B., Waldmann, P., Zahn, K.R., 1996b. The modulation of protective effects of the multixenobiotic resistance mechanism in a clam *Corbicula fluminea*. *Mar. Environ. Res.* 42 (1–4), 383–387.
- Kurelec, B., Britvic, S., Pivcevic, B., Smital, T., 1998. Fragility of multixenobiotic resistance in aquatic organisms enhances the complexity of risk assessment. *Mar. Environ. Res.* 46, 415–419.
- Kurelec, B., Krca, S., Pivcevic, B., Ugarkovic, D., Bachmann, M., Imsiecke, G., Müller, W.E.G., 1992. Expression of P-glycoprotein gene in marine sponges. Identification and characterization of the 125 kDa drug-binding glycoprotein. *Carcinogenesis* 13, 69–76.
- Kurelec, B., Smital, T., Pivcevic, B., Eufemia, N., Epel, D., 2000. Multixenobiotic resistance, P-glycoprotein, and chemosensitizers. *Ecotoxicology* 9, 307–327.
- Livingstone, D.R., Chipman, J.K., Lowe, D.M., Minier, C., Mitchelmore, C.L., Moore, M.N., Peters, L.D., Pipe, R.K., 2000. Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: recent molecu-

- lar, genotoxic, cellular and immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis* L.) and other mytilids. Int. J. Environ. Pollut. 13, 56–91.
- McFadzen, I., Eufemia, N.A., Heath, C., Epel, D., Moore, M.N., Lowe, D.M., 2000. Multidrug resistance in the embryos and larvae of the mussel *Mytilus edulis*. Mar. Environ. Res. 50, 319–323.
- Minier, C., Akcha, F., Galgani, F., 1993. P-glycoprotein expression in *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* in polluted seawater. Comp. Biochem. Physiol. 106B, 1029–1036.
- Minier, C., Eufemia, N., Epel, D., 1999. The multi-xenobiotic resistance phenotype as a tool to biomonitor the environment. Biomarkers 4, 442–454.
- Minier, C., Borghi, V., Moore, M.N., Porte, C., 2000. Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel, *Mytilus galloprovincialis*. Aquat. Toxicol. 50, 167–176.
- Parant, M., Pain, S., 2001. Potential use of multixenobiotic defense mechanism (MXDM) in *Dreissena polymorpha* as a biomarker for the monitoring of freshwater pollution. Water Res. 35, 3743–3748.
- Ringwood, A.H., Connors, D.E., Keppler, C.J., DiNovo, A.A., 1999. Biomarker studies with juvenile oysters (*Crassostrea virginica*) deployed in situ. Biomarkers 4, 400–414.
- Schröder, H.C., Badria, F.A., Ayyad, S.N., Batel, R., Wiens, M., Hassanein, H.M.A., Kurelec, B., Müller, W.E.G., 1998. Inhibitory effects of extracts from the marine alga *Caulerpa taxifolia* and of toxin from *Caulerpa racemosa* on multixenobiotic resistance in the marine sponge *Geodia cydonium*. Environ. Toxicol. Phar. 5, 119–126.
- Smital, T., Kurelec, B., 1997. Inhibitors of the multixenobiotic resistance mechanism in natural waters: In vivo demonstration of their effects. Environ. Toxicol. Chem. 16, 2164–2170.
- Smital, T., Kurelec, B., 1998. The activity of multixenobiotic resistance mechanism determined by rhodamine B-efflux method as a biomarker of exposure. Mar. Environ. Res. 46, 443–447.
- Smital, T., Sauerborn, R., Pivcevic, B., Krca, S., Kurelec, B., 2000. Interspecies differences in P-glycoprotein mediated activity of multixenobiotic resistance mechanism in several marine and freshwater invertebrates. Comp. Biochem. Physiol. 126C, 175–186.
- Toomey, B.H., Epel, D., 1993. Multixenobiotic resistance in *Urechis caupo* embryos: protection from environmental toxins. Biol. Bull. 185, 355–364.
- Toomey, B.H., Kaufman, M.R., Epel, D., 1996. Marine bacteria produce compounds that modulate multixenobiotic transport activity in *Urechis caupo* embryos. Mar. Environ. Res. 42, 393–397.
- Waldmann, P., Pivcevic, B., Müller, W.E.G., Zahn, R.K., Kurelec, B., 1995. Increased genotoxicity of acetylaminofluorene by modulators of multixenobiotic resistance mechanism: studies with the freshwater clam *Corbicula fluminea*. Mutat. Res. 342, 113–123.

**Sandrine Pain** is a PhD student working in the area of environmental toxicology. Her current research consists with studying the characteristics of multixenobiotic defence mechanism in *Dreissena polymorpha*. The aim of this research is to determine whether MXDM activity could represent a suitable biomarker of exposure to environmental stress.

**Marc Parant** is an assistant professor at the Ecotoxicity, Biodiversity and Environmental Safety (ESE) research unit. He is involved in the development of biomarkers for the assessment of freshwater pollution.

## Résumé

L'adaptation des êtres vivants à la pollution de leur environnement se traduit entre autre par la mise en place et le développement de systèmes de défense. Au niveau cellulaire, le **Mécanisme de Défense MultiXénobiotique (MDMX)**, également appelé Mécanisme de Résistance MultiXénobiotique ou MXR (MultiXenobiotic Resistance), protège les organismes de l'action toxique des xénobiotiques en limitant leur accès à la cellule et en favorisant leur élimination. Depuis la dernière décennie, un intérêt grandissant se porte sur l'utilisation potentielle du MDMX, en tant que biomarqueur d'exposition des organismes à la pollution organique.

Le travail présenté dans ce mémoire s'inscrit dans cette approche et vise à dégager les potentialités de l'activité MDMX à répondre aux différents critères requis pour constituer un biomarqueur pertinent. La mesure de l'activité MDMX a été effectuée par la méthode d'efflux chez un bivalve d'eau douce *Dreissena polymorpha*. La mise en œuvre d'une double approche *in situ* et en laboratoire a permis de mettre en évidence l'inductibilité de l'activité MDMX lorsque les organismes sont exposés à différents stress et plus particulièrement à des stress polluants. La réversibilité de l'induction mesurée a également été montrée en remplaçant les organismes en milieu propre suite à une période d'exposition. La dépuración en laboratoire d'organismes prélevés *in situ* a permis de mettre en évidence l'existence dans la population étudiée, du niveau basal de l'activité MDMX. Enfin l'étude de l'évolution saisonnière de l'activité mesurée chez des organismes transférés *in situ* pendant 15 mois a montré que les variations détectées étaient liées au cycle saisonnier du milieu naturel étudié au moyen de ses caractéristiques physico-chimiques. L'ensemble des résultats obtenus et l'interprétation qui a pu en être faite ont permis de mieux cerner les modalités de réaction du système chez des dreissènes exposées à un stress. En conclusion, le système MDMX étudié chez *Dreissena polymorpha* présente un réel potentiel à remplir le rôle d'un biomarqueur pertinent pour le suivi de la pollution organique dans les écosystèmes dulçaquicoles.

**Mots clés :** Défense Mulixénobiotique, Résistance Mulixénobiotique, Biomarqueur d'Exposition, Pollution Organique, Bivalves.

## Abstract

Many living being have adapted to life in impacted ecosystems owing to the presence and operation of defence mechanisms. At the cellular level, Multixenobiotic defence mechanism (MXDM), also known as multixenobiotic resistance mechanism (MXRM), functions as an extrusion pump to efflux organic compounds from the cells. It has raised attention during the last decade for its potential to be used as a biomarker of exposure to environmental pollution.

The present work fits in with this approach and aims to highlight potentialities of MXDM activity for being a relevant biomarker. MDMX activity was assessed by the efflux method in a freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. Results of *in situ* and laboratory experiments demonstrated the inductibility of MXDM activity when organisms were exposed to various stress and particularly to pollutional stress. Induction was shown to be reversible after replacing organisms in clean water after a period of exposure. Laboratory depuration of organisms collected *in situ* showed the existence of a basal MXDM level in the studied population. Finally, seasonal evolution of MXDM activity was assessed in transplanted organisms during a period of 15 months and results showed that MDMX variations were linked to the natural seasonal cycle of the studied ecosystem described by physicochemical parameters. All our results and their interpretation enables us to better understand MDMX reaction in organisms exposed to stress. To conclude, it seems that MDMX in *Dreissena polymorpha* could be considered as a relevant biomarker of exposure to organic pollution in freshwater ecosystems.

**Key words :** Mulixenobiotic Defence, Mulixenobiotic Resistance, Biomarker of Exposure, Organic Pollution, Bivalves.