



19726



THÈSE

présentée devant

L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour l'obtention du

DIPLÔME DE DOCTORAT

par

Caroline RICHERT

**COMPARAISON DE MARQUEURS BIOCHIMIQUES CHEZ LES
POISSONS (Induction de l'activité éthoxyrésorufine-0-dééthylase et inhibition de
l'activité acétylcholinestérase) ET D'INDICATEURS ÉCOLOGIQUES
(Peuplement de macroinvertébrés) POUR LE DIAGNOSTIC *IN SITU* DE LA
POLLUTION TOXIQUE DANS LES COURS D'EAU.**

Soutenue le 21 décembre 1994

Membres du jury:

Mme J. GIBERT
Mr M. LAFAURIE (Rapporteur)
Mr M. LAFONT
Mr G. MONOD
Mme P. VASSEUR (Rapporteur)
Mr E. VINDIMIAN

Résumé

L'ampleur et la complexité croissante de la pollution par les nombreuses molécules toxiques ont rendu indispensable le développement de différentes méthodes permettant la surveillance de la qualité chimique de l'eau.

De l'exposition chronique aux micropolluants découlent des désordres biologiques variés au sein des organismes et à l'échelle des écosystèmes. Ces désordres peuvent être utilisés comme biomarqueurs de contamination du milieu aquatique. Cependant, l'enjeu de la bioévaluation *in situ* est non seulement de déceler des perturbations à un niveau ou à un autre de l'édifice vivant mais également d'être en mesure d'identifier les causes, sur la base de relations de causes à effets préalablement établies.

Les monoxygénases à cytochrome **P450** sont des enzymes de biotransformation dites de détoxification, intervenant dans le métabolisme des xénobiotiques, en vue de leur excrétion. La forme **P450IA1** chez les poissons est inductible par des classes de molécules spécifiques parmi les micropolluants majeurs de l'environnement (**HAPs, PCBs, dioxines...**). Les quantités de **P450IA1** sont évaluées par dosage de l'activité Cthoxyrésorufine-0-dééthylase (EROD) qu'ils catalysent spécifiquement. L'induction de l'activité EROD est proposée comme marqueur biochimique de la présence de xénobiotiques de type **HAPs, PCBs, dioxines...** dans l'eau.

L'objectif de ce travail est de préciser l'intérêt et les limites de l'utilisation de l'activité EROD hépatique des poissons en tant que biomarqueur de pollution des rivières.

Selon les sites étudiés (Durance, Ardières, Moselle), les informations apportées par ce marqueur biochimique sont confrontées à celles que procurent les dosages de micropolluants, l'étude des peuplements de macroinvertébrés *et/ou* d'oligochètes (indicateurs écologiques) et l'inhibition de l'activité acétylcholinestérase (AChE), un autre marqueur biochimique.

Sur la Durance, l'impact toxique d'une usine chimique est mis en évidence au niveau de l'activité EROD des poissons et sur le peuplement d'oligochètes. La réponse EROD est cependant faible à nulle en période hivernale. Au mois de mai et août, les taux d'induction sont très élevés chez les 3 espèces étudiées (***Leusciscus cephalus*, *Barbus barbus*, *Chondrosroma nasus***). Une corrélation positive et significative entre l'induction EROD et le taux de **PCBs** totaux hépatiques est **obtenue** en aval de l'usine chez ***Leusciscus cephalus*** et chez ***Barbus barbus***.

Sur l'**Ardières**, une contamination d'origine industrielle s'exprime dès l'amont sur l'activité EROD mesurée chez l'espèce **Noemacheilus barbarulus**. Dans le secteur aval, elle s'amplifie d'une pollution diffuse par les produits phytosanitaires répandus sur les vignobles du bassin-versant. Les réponses EROD mesurées en aval, au cours de 4 saisons d'échantillonnage sur **Noemacheilus barbarulus** et **Leusciscus cephalus**, sont variées (induction, inhibition) et délicates à interpréter dans ce contexte de pollution complexe (présence d'inducteurs et d'inhibiteurs de l'activité EROD, forte variabilité saisonnière de la contamination). L'espèce **Gobio gobio** ne présente pas de variations d'activité EROD significatives entre les différentes stations étudiées. Cependant, le biomarqueur EROD s'est révélé plus efficace que l'activité enzymatique AChE pour mettre en évidence l'impact des produits phytosanitaires sur les poissons. Le peuplement de macroinvertébrés benthiques est, quant à lui, fortement perturbé par les toxiques qui contaminent l'**Ardières** dans son secteur aval.

Sur la Moselle, les impacts toxiques de différents effluents industriels et urbains s'expriment sur l'activité EROD des 3 espèces étudiées (**Leusciscus cephalus**, **Barbus barbus**, **Chondrosroma nasus**) et sur les peuplements d'oligochètes.

Sur les trois sites étudiés, les deux types d'indicateurs biologiques utilisés (l'activité EROD et les peuplements de macroinvertébrés) s'accordent à mettre en évidence une contamination toxique en aval de rejets de natures chimiques bien distinctes. Le biomarqueur EROD constituant un signal précoce d'intoxication des poissons par une catégorie de polluants aux propriétés très toxiques, ce constat permet d'accorder une certaine valeur prédictive à la réponse du biomarqueur EROD quant à un danger encouru par l'écosystème aquatique.

Cependant, l'ensemble des résultats met en évidence la forte variabilité de la réponse de l'activité EROD aux inducteurs en fonction de l'espèce du poisson, des facteurs endogènes et environnementaux saisonniers (ex: état physiologique, température) mais aussi en fonction de la présence de substances toxiques inhibitrices ou modulatrices du système de biotransformation. Tous ces facteurs doivent être pris en compte pour la mise en oeuvre de ces biomarqueurs dans la surveillance du milieu aquatique. Aussi, nous dressons un bilan des données acquises lors de nos travaux ainsi qu'en bibliographie qui peut aider à la mise en place d'études de bioévaluation de la qualité de l'eau *in situ* et nous proposons de poursuivre les travaux de recherche pour l'amélioration de cet outil en rivière.

Quoiqu'il en soit, l'intérêt de la mesure de l'activité EROD est multiple. En particulier, il réside dans sa spécificité, sa sensibilité, sa rapidité de réaction à une exposition toxique et dans sa capacité à intégrer l'es effets de nombreux polluants. Le dosage enzymatique est également simple et peu coûteux.

Tables des matières

Résumé..	7
Liste des abréviations	9
Introduction	17

A Pollution chimique et bioévaluation de la qualité des eaux douces

A.1 La pollution chimique..	21
A.2 Les risques pour les organismes aquatiques	21
A.2.1 Notion de biodisponibilité..	22
A.2.2 Intoxication des poissons	22
A.2.3 Effets des toxiques sur les poissons	23
A.3 Stress et santé de l'écosystème	26
A.3.1 Notion de stress et de perturbation	26
A.3.2 Evaluation de la santé d'un écosystème	27
A.4 les moyens de surveillance de l'environnement aquatique	28
A.4.1 Dosage des polluants au niveau des différents compartiments..	28
A.4.2 Bioévaluation de la qualité des eaux douces	30
A.4.2.1 Définitions	30
A.4.2.2 La réalisation de bioessais en laboratoire	31
A.4.2.3 Les mesures des effets toxiques <i>in situ</i>	31
A.4.3 Bioévaluation <i>in situ</i>	31
A.4.3.1 L'approche écotoxicologique	31
A.4.3.2 L'approche biocénotique	32
A.5 La gestion écologique des pollutions chimiques	35
A.5.1 Nécessité d'une gestion écologique	36
A.5.2 Gestion à l'échelle du bassin-versant	36
A.5.3 De la recherche à la gestion	36
A.5.14 Choix de méthodes de surveillance de la qualité de l'eau <i>in situ</i>	37
A.6 Conclusion	39

B Les enzymes de détoxification des poissons

B.1 Biotransformation	41
B.2 Les monooxygénases à Cytochromes P450	41
B.3 De la super famille des cytochromes P450 à l'isoenzyme CYP1A1 des poissons	42
B.3.1 Caractérisation des P450 et nomenclature	42
B.3.2 Caractérisation des cytochromes P450 chez les poissons	43
B.4 Induction des P450	44
B.4.1 Modèle d'action	44
B.4.2 Méthodes de détection	45
B.4.3 Les inducteurs des monooxygénases à P450IA de poissons	45
B.4.4 Activités enzymatiques induites par les inducteurs de type HAP	49
B.4.5 Les principales caractéristiques de l'induction	49
B.4.5.1 Rapidité	49
B.4.5.2 Concentration-dépendance	50
B.4.5.3 Réversibilité	50
B.5 Induction et toxicité	51
B.6 Inhibition	52
B.6.1 Généralité	52
B.6.2 Les classes d'inhibiteurs	53
B.7 Les facteurs de variation des activités monooxygénases	54
B.7.1 Cycle de vie annuel des poissons	54
B.7.2 Les facteurs endogènes	55
B.7.3 Les facteurs exogènes	56
B.8 Conclusion	60

C Activité EROD et bioévaluation *in situ*

C.1 Rappels	61
C.2 Situations de contamination étudiées <i>in situ</i>	61
C.3 Choix de l'activité EROD	61
C.4 Utilisation du biomarqueur EROD <i>in situ</i>	62
C.5 Conclusion	66

D Matériel et méthodes

D.1 Démarche scientifique	67
D.2 Les poissons étudiés	68
D.2.1 Classification	68
D.2.2 Principales caractéristiques écologiques des espèces	69
D.3 Analyses biochimiques EROD et AChE	71
D.3.1 Prélèvement et conservation des échantillons de foies et de muscles de poisson	72
D.3.2 Dosage de l'activité EROD	72
D.3.3 Dosage de l'activité AChE	73
D.3.4 Calcul des taux d'induction EROD et d'inhibition AChE	73
D.3.5 Traitement statistique des résultats	73
D.4 Analyses biocénétiques	73
D.4.1 Prélèvement des macroinvertébrés benthiques	73
D.4.2 Prélèvement des oligochètes	74
D.5 Dosages de micropolluants dans les sédiments et les foies de poissons	76

E Caractérisation de l'impact d'une usine sur la qualité de la Durance

E.1 Présentation du site	77
E. 1.1 Caractéristiques de la moyenne Durance	77
E. 1.2 Inventaire des principales sources de pollution	79
E. 1.3 Constat de dégradation en aval de l'usine de Saint-Auban	80
E.2 Présentation de l'étude	84
E.2.1 Les campagnes de prélèvements	85
E.2.2 Sélection des stations	85
E.2.3 Caractéristiques physico-chimiques des stations étudiées	85
E.3 Induction de l'activité EROD	88
E.3.1 Effet station	88
E.3.2 Effet saison	90
E.3.3 Effet espèce	* 92
E.3.4 Recherche des inducteurs	96
E.3.4.1 Matériel et méthodes	97

E.3.4.2 Résultats	97
E.4 Etude des peuplements de macroinvertébrés benthiques	101
E.4.1 Structure globale du peuplement de macroinvertébrés	101
E.4.2 Structure du peuplement d'oligochètes	102
E.5 Conclusion	105

F Caractérisation de l'impact de pollutions diffuses d'origine agricole sur l'Ardières

F.1 Présentation du bassin-versant de l'Ardières	107
F. 1.1 Caractéristiques du bassin de l'Ardières	107
F. 1.2 Inventaire des sources de pollution	107
F. 1.3 Constat de dégradation des eaux de l'Ardières	108
F. 1.4 La pollution d'origine agricole du bassin-versant de l'Ardières	109
F. 1.4.1 Les produits phytosanitaires	109
F.1.4.2 La pollution par des pesticides..	110
F. 1.4.3 Utilisation des pesticides sur le bassin de l'Ardières	111
F. 1.5 Etudes d'impacts des activités agricoles sur la qualité de l'Ardières	112
F.1.5.1 Contamination chimique de l'Ardières	112
F. 1.5.2 Qualité biologique de l'Ardières	115
F. 1.6 Conclusion	118
F.2 Présentation de l'étude	119
F.2.1 Calendrier des prélèvements réalisés en 1991	119
F.2.2 Sélection des stations..	119
F.2.3 Caractéristiques physico-chimiques des stations étudiées	120
F.3 Induction de l'activité EROD..	121
F.3.1 Effet station	122
F.3.2 Effet espèce	123
F.3.3 Effet saison	124
F.3.4 Discussion	126
F.4 Inhibition de l'activité AChE	131
F.4.1 Généralités..	131
F.4.2 Effet station	132
F.4.3 Effet espèce	133
F.4.4 Conclusion	134
F.5 Etude du peuplement de macroinvertébrés benthiques	134
F.6 Conclusion	138

G Caractérisation de la qualité de la Moselle

G.1 Présentation du site	141
G.2 Présentation de l'étude	141
G.2.1 Les différentes analyses	141
G.2.2 Sélection des stations	142
G.2.3 Caractéristiques chimiques des stations étudiées	143
G.2.4 Caractéristiques écotoxicologiques des effluents étudiés	145
G.3 Induction de l'activité EROD <i>in situ</i>	146
G.3.1 Effet station	147
G.3.2 Effet espèce	147
G.4 Etude des peuplements d'oligochètes	149
G.5 Conclusion	151

Discussion sur l'utilisation de l'activité EROD en bioévaluation *in situ*

1 Activité EROD de référence	153
1.1 Effet site	153
1.2 Effet sexe	154
1.3 Effet saison	155
2 Induction de l'activité EROD	156
2.1 Effet saison	157
2.2 Effet espèce	158
3 Taille des échantillons de poissons	160
4 Signification écotoxicologique de la réponse EROD	162
4.1 L'information chimique face à l'information biologique	162
4.2 L'information biochimique face à l'information écologique	162
5 Les options méthodologiques	164
5.1 Le "Caging"	164
5.2 Techniques de mise en évidence de l'induction de l'enzyme P450IA	165

Conclusion générale 167

Références bibliographiques

Liste des Annexes

Annexe I: Méthodes de dosage de l'activité EROD et des protéines.

Annexe II: Méthodes de dosage de l'activité AChE.

Annexe III: Tableaux récapitulatifs des activités EROD hépatiques par espèce, mois d'échantillonnage et sexe, relevées chez les poissons pêchés

A- sur les stations de référence pour les trois sites étudiés

B- sur les autres stations pour les trois sites étudiés.

Annexe IV: Hydrogrammes des débits journaliers relevés au niveau d'une station hydrométrique sur le Lauzon à la Brillanne en 1991 et 1993.

Annexe V: Tableau présentant les différents paramètres mesurés, dosés ou calculés sur chaque poisson pêché dans la Durance en mai 1993.

Introduction

Depuis l'essor des activités humaines, notre environnement subit de nombreuses agressions aux formes multiples, physiques par les aménagements, et chimiques par les pollutions aiguës ou chroniques. En particulier, l'eau, élément constitutif essentiel de notre environnement et ressource vitale pour l'ensemble des êtres vivants, est également le récepteur et le vecteur des nombreux déchets toxiques, et participe ainsi à la généralisation de la pollution à l'ensemble du globe terrestre.

La pollution permanente liée aux rejets industriels, aux eaux usées d'origine urbaine et à l'emploi de pesticides et d'engrais en agriculture a contribué insidieusement à la dégradation de la qualité de l'eau. A l'heure actuelle, les effets chroniques des micropolluants largement dispersés dans le milieu aquatique, représentent à plus ou moins long terme une réelle menace pour la vie des organismes et l'équilibre des écosystèmes aquatiques. La prise de conscience des risques encourus par la collectivité a stimulé, à juste titre, la pratique de contrôles fréquents de la qualité chimique de l'eau. Pendant longtemps, la surveillance de l'environnement n'a reposé que sur des analyses physico-chimiques et le dosage de certains polluants. Il était donc nécessaire de développer des méthodes analytiques de plus en plus sensibles et les limites de détection sont ainsi passées successivement du centigramme au milligramme puis au microgramme par litre (Rodier, 1984).

Devant le nombre et la complexité des analyses chimiques à réaliser, et les limites d'interprétation des informations apportées par ces paramètres, le développement de méthodes biologiques permettant d'évaluer la qualité écologique des écosystèmes mais aussi de prédire les impacts des pollutions anthropogéniques, s'est révélé nécessaire à la préservation et la restauration des milieux aquatiques (Petts et Amoros, 1993).

Les recherches se sont donc orientées en fonction des préoccupations des gestionnaires et de nombreuses méthodes de bioévaluation de la qualité de l'eau ont vu le jour, en particulier des méthodes biochimiques et biocénotiques, visant à répondre à leurs principales exigences des gestionnaires:

- ➡ Evaluer le niveau de contamination de l'eau,
- ➡ Diagnostiquer les causes des effets toxiques observés,
- ➡ Prédire les risques encourus par l'écosystème.

Cet ensemble d'idées et d'enjeux a motivé ce travail dont l'objectif est de participer à la validation d'une méthode biochimique de détection de la présence de micropolluants majeurs dans l'environnement, les variations d'activité des monooxygénases à cytochrome P450.

Sur le plan conceptuel, ces enzymes de biotransformation suscitent beaucoup d'intérêt dans le domaine de la bioévaluation de la qualité de l'eau. Cependant, des interrogations pratiques

dans la mise en oeuvre de cet outil se posent et justifient les travaux de recherche développés en milieu marin et en eau douce:

Est-il possible de construire à partir du système de biotransformation des poissons un indicateur simple et facilement interprétable qui puisse informer sur le niveau de contamination de l'eau?

Quelles informations originales peut-il nous apporter dans le domaine de la bioévaluation où déjà plusieurs méthodes sont proposées?

Ces questions auxquelles nous tenterons de répondre ont orienté nos travaux de recherche dont les résultats et la synthèse sont présentés dans ce mémoire.

La première partie présente, dans une synthèse bibliographique, les notions essentielles pour définir le cadre de notre étude.

Dans un premier temps, nous présentons les effets toxiques des micropolluants à l'échelle des organismes et des écosystèmes ainsi que les moyens de surveillance nécessaires à une gestion de l'environnement aquatique.

Dans un deuxième temps, nous présentons les monoxygénases à cytochrome P450 (enzymes de détoxification) impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques. Nous nous intéressons plus particulièrement au cytochrome P450IA1 des poissons, aux polluants inducteurs et inhibiteurs ainsi qu'aux facteurs de variation des activités monoxygénases.

Dans un troisième temps, nous présentons l'intérêt et les caractéristiques de l'activité enzymatique EROD en tant que marqueur biochimique d'exposition à une catégorie de toxiques, dans le cadre des études de bioévaluation *in situ*.

La deuxième partie présente les espèces de poissons étudiées au cours de nos travaux, les méthodes de dosage des activités éthoxyrésorufine-0-dééthylase (EROD) et acétylcholinestérase (AChE), les tests statistiques de comparaisons de moyennes employés ainsi que les protocoles de prélèvement des macroinvertébrés.

La troisième partie présente les études de bioévaluation *in situ* réalisées sur trois sites:

La Durance: Caractérisation de l'impact des rejets d'une usine chimique sur l'activité EROD des poissons ainsi que sur le peuplement de macroinvertébrés au cours de quatre campagnes de prélèvement.

L'Ardières: Caractérisation de l'impact des pollutions diffuses par les produits phytosanitaires sur l'activité EROD mais aussi sur un autre marqueur biochimique, l'activité AChE des poissons et sur le peuplement de macroinvertébrés (indicateur écologique) au cours de quatre campagnes de prélèvement.

La Moselle: Caractérisation de l'impact de plusieurs rejets industriels et urbains sur l'activité EROD des poissons et sur le peuplement d'oligochètes lors d'une unique campagne de prélèvement.

La quatrième partie intègre, dans une discussion, les résultats de nos travaux et les données bibliographiques en ce qui concerne l'utilisation du biomarqueur EROD. Une comparaison des informations apportées par les différents marqueurs chimiques, biochimiques et biologiques utilisés est également réalisée. Ainsi, nos travaux permettent de préciser l'intérêt et les limites de l'utilisation de ces biomarqueurs dans une problématique de biosurveillance de la qualité de l'eau *in situ*.

La conclusion remet notre étude dans son contexte scientifique et propose un bilan synthétique de nos observations sur l'activité EROD et son utilisation en bioévaluation de la qualité du milieu aquatique.

Conclusion générale

Ce travail s'inscrivait dans une problématique de développement de méthodes de bioévaluation *in situ* de la qualité du milieu aquatique.

Notre objectif général était d'aider à la validation des monooxygénases à cytochrome P450 IA1 hépatiques des poissons en tant que biomarqueurs d'exposition à des polluants. Nous avons utilisé l'activité éthoxyrésorufine-O-dééthylase ou EROD pour détecter les variations d'activité de ces monooxygénases liées à la présence de micropolluants organiques dans l'eau. En France, ces travaux sont bien avancés en milieu marin puisque l'activité EROD est actuellement proposée à titre expérimental pour 4 ans dans le Réseau National d'observation de la qualité des côtes françaises. En eau douce, les finlandais et les suédois valident actuellement l'utilisation de l'activité EROD pour la surveillance des effluents de papeteries.

L'activité EROD répond à la présence de polluants majeurs du milieu aquatique: HAPs, PCBs, dioxines. A ce titre, l'utilisation du biomarqueur EROD pour évaluer le niveau de contamination d'un cours d'eau par ces polluants toxiques et persistants, se justifie dans la plupart des cas.

Sur la Durance, l'augmentation de l'activité EROD a traduit une influence des rejets chimiques de l'usine sur les poissons pêchés jusqu'à 30 km en aval.

Sur l'Ardières, les variations de l'activité EROD ont révélé la présence de toxiques inducteurs et/ou inhibiteurs. Dans le secteur aval, la contamination par les produits phytosanitaires est complexe, elle se caractérise par une grande variété de toxiques aux propriétés peu ou pas connus et par des phénomènes complexes de transfert vers la rivière. L'utilisation de l'activité EROD pour mettre en évidence l'impact de rejets diffus d'origine agricole (produits phytosanitaires) ne peut donc être simple. Malgré tout, le biomarqueur EROD s'est révélé plus efficace que l'activité AChE et les résultats encouragent à développer les recherches sur les effets des pesticides sur l'activité EROD en laboratoire et *in situ*.

Sur la Moselle, l'utilisation de l'activité EROD *in situ*, comme en laboratoire, a permis de mettre en évidence l'impact de plusieurs effluents industriels et urbains sur la qualité de l'eau.

Nos résultats ont donc montré,

d'une part, la grande sensibilité du biomarqueur EROD puisque sa réponse est modulée de façon significative en fonction du niveau de contamination,

d'autre part, sa capacité d'intégration des effets de nombreux polluants que nous ne sommes toutefois pas capables d'interpréter à l'heure actuelle par méconnaissance des propriétés (inductrices ou inhibitrices) de beaucoup de toxiques, et par ignorance des mécanismes mis en jeu.

Nous avons également constaté que le biomarqueur EROD répondait dans de nombreux cas où la dégradation de l'écosystème en aval de pollutions chimiques avaient été constatée par l'examen des peuplements d'invertébrés. Si on ajoute à cela son caractère précoce dans les évènements d'intoxication, cela permet d'envisager son utilisation pour signaler les dangers encourus par l'écosystème.

Cependant, l'ensemble de nos travaux met en évidence ou confirme plusieurs éléments essentiels à prendre en considération lors de l'utilisation du biomarqueur EROD *in situ* tels que les fortes variabilités intra et inter spécifiques de la réponse biochimique mais également les variations liées au mois d'échantillonnage des poissons.

Le Chevaine (***Leusciscus cephalus***) est l'espèce qui nous paraît actuellement la plus fiable pour mettre en évidence un impact de rejet polluant sur les monooxygénases. Cependant l'intérêt potentiel des autres espèces étudiées en particulier le Barbeau (***Barbus barbus***) et le Hotu (***Chondrostoma nasus***) ne doit pas être négligé, et des études approfondies sur le comportement des systèmes de biotransformation chez ces espèces benthiques doivent être envisagées dès à présent.

Il paraît également indispensable de disposer pour chaque station étudiée d'un échantillon de poissons suffisamment important pour pouvoir intégrer dans les résultats la forte variabilité intra spécifique de la réponse EROD.

Les réponses EROD aux inducteurs obtenues en période hivernale pour l'ensemble des espèces étudiées sont apparues faibles ou inexistantes. Nos résultats confirment l'idée que le système de biotransformation et ses potentialités évoluent au cours du cycle saisonnier. En conséquence, nous déconseillons d'échantillonner pendant cette saison lorsque l'objectif de l'étude est d'évaluer la qualité d'un milieu ou de caractériser le potentiel inducteur d'un rejet.

Nous avons également souligné l'importance de disposer de stations de référence situées sur le même cours d'eau et en amont des secteurs contaminés.

De plus, le biomarqueur EROD n'étant pas approprié à tous les types de contaminations, dans le cadre de la surveillance, il convient de l'associer à d'autres marqueurs biochimiques mais aussi écologiques.

D'une manière générale, les connaissances incomplètes limitent encore l'utilisation en routine des **biomarqueurs** en surveillance. Les études expérimentales *in situ* nous ont permis de souligner les difficultés d'application d'une méthode sur le terrain et de proposer des orientations de recherche qui permettront d'améliorer l'outil.

En particulier, nous proposons diverses options méthodologiques dans l'utilisation du biomarqueur EROD:

le "caging" qui permet notamment de s'affranchir des difficultés liées à l'échantillonnage du poisson et,

la détection immuno-enzymatique des **P450IA1** qui permet en particulier de doser les enzymes **P450IA** dont l'activité catalytique est inhibée. Ce dosage permet de préciser si l'absence d'induction de l'activité EROD est liée à l'absence d'agents inducteurs ou bien à la présence d'inhibiteurs.

En particulier, dans cas du biomarqueur EROD, il paraît également indispensable de poursuivre des recherches sur les facteurs influençant le cytochrome **P450** et le système de biotransformation et de les développer à propos des mécanismes d'inhibition, car dans les situations complexes de terrain un ensemble de paramètres environnementaux viennent perturber la réponse EROD spécifique aux inducteurs présents.