

FORMATION CONTINUE – ARTICLE DE SYNTHÈSE

Biomarqueurs et Bioindicateurs chez les vertébrés: importance dans l'évaluation de la santé d'un écosystème

LESSIRE F., DELAUNOIS, A., GUSTIN P., ANSAY M.

Service de pharmacologie-toxicologie
Faculté de médecine vétérinaire, ULG
B41, Bd. de Colonster, 4000 Sart Tilman- Liège

RESUME. L'environnement est devenu une préoccupation de plus en plus importante partagée par la population comme par les instances législatives et scientifiques. L'évaluation de sa qualité ou des dommages subis doit suivre une approche rigoureuse et standardisée. Cet article développe les différents aspects d'une méthode d'évaluation et démontre quelles en sont les limites. Dans une seconde partie, il décrit de nouveaux outils de prédiction de la santé environnementale: les biomarqueurs et les bioindicateurs. Les principales indications de ces outils biologiques sont développées. Certains biomarqueurs sont décrits avec plus de détails.

INTRODUCTION

La croissance de la population mondiale et dans une mesure plus grande encore, de l'activité économique a amené, à l'échelle de la planète, des modifications importantes du biotope (Munda *et al.*, 1994; Kushlan, 1993). Ayant à faire face à l'introduction de xénobiotiques, la physiologie des organismes tant animaux que végétaux répond par des tentatives d'ajustement, en vue d'une adaptation optimale à ce nouvel environnement (Fox, 1993). Mais ces réponses peuvent dépasser les potentiels normaux d'adaptation et perturber les fonctions habituelles réduisant ainsi considérablement les chances de survie (Fossi *et al.*, 1994; Fox, 1993). C'est dans ce contexte qu'une science nouvelle, l'écotoxicologie, s'est intéressée au devenir des toxiques dans l'environnement et de leurs effets sur les organismes vivants, en tenant compte des interactions entre ceux-ci et leur écosystème (Beasley, 1993; Forbes et Forbes, 1994). Elle se doit de fournir

des indications sur l'importance du risque écologique (Risk assessment) afin de prévoir les conséquences de l'exposition aux divers polluants sur l'écosystème et d'y remédier (Beasley, 1993; Fox, 1993; Hoffman *et al.*, 1995).

LA NOTION DE RISQUE

Le risque est généralement défini comme l'évaluation de la probabilité d'un dommage (lésion, maladie, mort) dans des circonstances spécifiques.

L'évaluation du risque environnemental (Environmental Risk assessment) se définit comme l'ensemble des procédures et des méthodes scientifiques à mettre en œuvre pour évaluer soit le risque de toxicité soit les effets toxiques déjà existants de substances anthropogéniques (Depledge et Fossi, 1994).

La thèse du Risk assessment (R.A.) s'appuie sur le développement suivant (Depledge et Fossi, 1994):

1) Un organisme ne fonctionne normalement que dans l'hypothèse où la stabilité de certaines conditions biochimiques et physiologiques est garantie.

2) Certaines de ces conditions sont telles que toute déviation importante constitue une menace pour les caractères structurels et fonctionnels de l'individu.

3) On peut quantifier pour un individu, pour sa communauté et pour l'écosystème dans lequel il vit la probabilité de voir ces conditions physiologiques et biochimiques de fonctionnement perturbées suite à l'exposition à un toxique.

L'évaluation du risque (R.A) permet d'identifier, de caractériser et de quantifier le risque en vue de le réduire, de l'éliminer ou de l'ignorer. Les enjeux présidant à ces différentes étapes consistent à minimiser les risques pour la santé humaine, à s'assurer que les écosystèmes peuvent se maintenir par eux-mêmes et à défendre la survie de certaines espèces (De Snoo *et al.*, 1994).

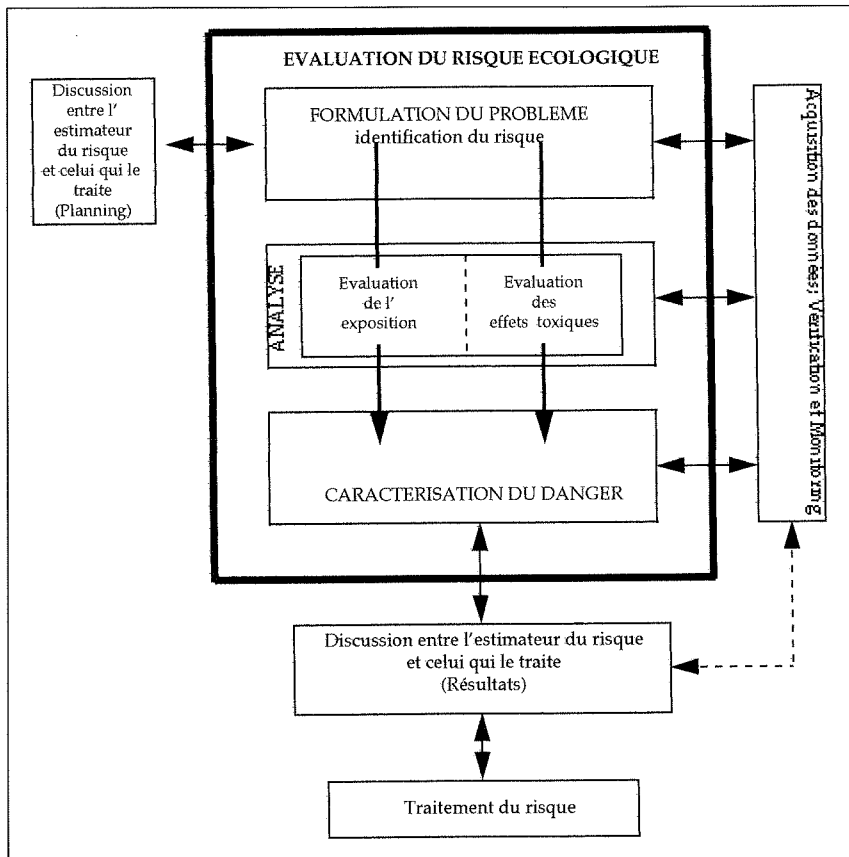


Figure 1
Schéma directeur pour l'évaluation du risque environnemental
(D'après Braen Norton et al., 1995)

L'évaluation du risque comprend 4 parties (figure 1) :

(Beasley, 1993, Mumtaz *et al.*, 1993)

- l'identification du risque
- l'évaluation de la toxicité
- l'évaluation de l'exposition
- la description et la caractérisation du risque

Identification du risque

L'identification du risque passe par l'inventaire et la quantification des substances chimiques présentes, dans le milieu, que ce soient l'eau, le sol, les plantes, les tissus ou les fluides corporels (De Snoo *et al.*, 1994; Depledge, 1994). Ensuite, les types de transformation auxquelles ces substances stressantes peuvent être soumises pendant leur transport ou leur dépôt sont analysés. De fait, de nombreux facteurs influencent le devenir des xénobiotiques dans l'environnement. Ces facteurs sont intrinsèques tels que la structure moléculaire (relation structure/activité: QSAR), la solubilité dans l'eau (KOC: coefficient de

partition octanol/eau) et dans les solvants, la tension de vapeur, la taille, le spectre d'absorption, la tendance à l'adsorption sur des solides, ou la volatilité. Mais les caractéristiques du biotope où ces substances sont déposées ou stockées interviennent également: pH, salinité, température, photolyse, dégradation microbienne (Forbes et Forbes, 1994)... La sensibilité des différentes espèces constitutives de l'écosystème est aussi déterminée.

Evaluation de la toxicité

Cette évaluation se fait par deux voies: les données de laboratoire et les données épidémiologiques.

Les données de laboratoire

- Le pouvoir toxique d'une molécule peut être évalué à partir de sa structure chimique (QSAR) (Depledge, 1994; Forbes et Forbes, 1994). Ainsi, à l'intérieur de la famille des PCBs (biphényles polychlorés), la toxicité des composés est influencée par le nombre d'atomes de chlore

présents sur la molécule et par leur position, assurant ou non une structure planaire (Peakall, 1994). L'industrie produisant une gamme de plus en plus étendue de molécules différentes, le pouvoir toxique est de plus en plus souvent évalué par le biais de la comparaison de la structure du nouveau composé avec une substance de toxicité connue.

- La relation dose/effet est déterminée en expérimentant, pendant une période de temps définie, sur des groupes d'organismes, des organes isolés ou des cultures cellulaires l'effet d'un spectre de concentrations de la substance à tester (Depledge, 1994; Forbes et Forbes, 1994). Le modèle ainsi obtenu va servir ultérieurement pour prédire la probabilité et l'importance de la réponse vis à vis du même danger dans des circonstances similaires (Hoffman *et al.*, 1995).

La courbe décrivant cette relation peut prendre différentes formes (Ramade, 1977):

a) Si les effets irréversibles sont additionnés quelles que soient la durée et les modalités de l'exposition, la fonction est linéaire.

b) Si les phénomènes de détoxification de l'organisme rendent cette accumulation partielle, la fonction apparaîtra sigmoïde.

c) Certaines courbes peuvent traduire des effets antagonistes. C'est le cas de certaines substances indispensables à l'organisme à faibles doses qui deviennent toxiques à fortes doses (par exemple: le fluor).

L'analyse de cette relation permet la détermination des DL50 (dose létale 50), CL50 (concentration létale 50) et met en évidence l'existence d'un seuil c'est à dire d'une concentration à laquelle ou au-dessous de laquelle aucun effet n'est observé. Ce seuil est appelé NO(A)EL: no observed (adverse) effect level (Peakall, 1992) ou NOEC: no observed effect concentration (Hoffman *et al.*, 1995). La dose de référence (Rfd) ou dose maximale admissible est également calculée en divisant le NOAEL par un facteur de sécurité. Ce facteur provient de l'estimation du rapport de doses produisant une intoxication chronique et aiguë (généralement 100 ou 1000). S'il n'y a pas de seuil dans la relation

dose/effet, des experts appartenant à différentes instances (économiques, politiques, scientifiques,...) définissent une dose pour laquelle le risque est qualifié d'acceptable (Ramade, 1977; Forbes et Forbes, 1994).

Les données épidémiologiques (Peakall, 1992).

L'épidémiologie s'intéresse aux circonstances de l'émergence d'une maladie à un moment bien défini de la vie d'une population. L'analyse des données épidémiologiques doit être faite avec prudence. En effet, ce type d'études étant plus souvent rétrospectif que prospectif, tous les facteurs intervenus pour obtenir les effets observés ne sont pas toujours tous identifiés (Who Report, 1995). De plus, l'épidémiologie observe davantage des relations de cause à effet que des relations dose/effet (Depledge, 1994). L'analyse épidémiologique doit prendre en considération le temps écoulé entre l'exposition et l'apparition des effets, la spécificité de la corrélation et sa force, la plausibilité biologique. Il est évident que les effets tels qu'ils sont constatés par l'étude épidémiologique doivent pouvoir être répliqués en laboratoire.

Evaluation de l'exposition

L'importance, la fréquence, la durée, les voies d'exposition sont évaluées. L'exposition se fait par 3 voies: par ingestion, par inhalation et par absorption transcutanée. Par exemple, l'exposition à l'ozone dépendra de l'heure de la journée, de la circulation automobile, de l'ensoleillement et de l'activité physique qui stimule les échanges respiratoires. L'apport de chacune des trois voies est estimé. La dose reçue est calculée et comparée à la dose maximale acceptable par jour.

Les effets découlant d'une exposition s'étendant sur toute la vie sont extrapolés.

L'agence européenne du médicament propose le rapport PEC/PNEC (concentration environnementale prédite/concentration prédite sans effet) assortie d'un facteur de sécurité comme valeur pivot au niveau des prédictions.

Caractérisation du danger

Les étapes précédentes sont intégrées pour définir la probabilité et l'ampleur du danger ainsi que les marges d'erreur liées à toute étude de ce type (Hoffman *et al.*, 1995).

Les erreurs ou les incertitudes peuvent provenir sommairement de facteurs biologiques ou non biologiques:

Facteurs biologiques

1 - L'étude de la relation dose/effet s'effectue sur un petit nombre d'espèces standardisées. On choisit dans ce cas les espèces réputées les plus sensibles. Par exemple, la truite arc-en-ciel est généralement sélectionnée pour l'évaluation du risque en milieu aquatique (Forbes et Forbes, 1994). Pour éviter toute variation génétique, certains utilisent même des clones (Lovett Doust *et al.*, 1994). La relation doit ensuite être extrapolée à l'homme et aux espèces concernées. L'extrapolation d'une espèce à l'autre, et en particulier à l'homme n'est pas exempte de risques. Le cas du thalidomide (Softenon™) encore présent dans les mémoires en est un exemple troublant. C'est la raison pour laquelle des facteurs de sécurité sont employés, avant d'extrapoler une dose ou un effet d'une espèce à l'autre. Les évaluations plus fines doivent également tenir compte au niveau de la population des différences de risques encourus en fonction de l'âge ou du sexe. En effet, vis-à-vis de certains toxiques, le sexe et l'âge jouent un rôle dans la définition de la susceptibilité d'une espèce (Lloyd *et al.*, 1991). Ainsi, la sensibilité des rats vis à vis du parathion diffère suivant le sexe et l'âge des animaux (Benke et Murphy, 1975).

2 - La disparition de certaines espèces crée des déséquilibres au niveau de la chaîne alimentaire, avec prolifération de certaines espèces au détriment d'autres. Evaluer l'importance des interactions entre les différentes populations présentes sur le site est un problème délicat à traiter (Hoffman *et al.*, 1995; De Snoo *et al.*, 1994).

3 - La biomagnification, consistant en un transfert et une accumulation

de substances lipophiles, non métabolisées, via la chaîne alimentaire produit des résidus particulièrement toxiques pour les prédateurs terminaux (crocodiles, dauphins, hommes) (Franke *et al.*, 1994; Peakall *et al.*, 1992; Ansay, 1994).

Pour tenter d'élucider et de simuler les influences interspécifiques sur le terrain, les tests de laboratoire ont été modifiés afin de faire intervenir plusieurs espèces ou plusieurs niveaux trophiques dans des microcosmes reconstitués (Forbes et Forbes, 1994; Lovett Doust *et al.*, 1994; O'Brien *et al.*, 1993).

4- la présence du contaminant étant prouvée, aucune indication n'est fournie quant à la biodisponibilité et à l'activité biologique des xénobiotiques ou des métaux (Moore *et al.*, 1994, Melancon, 1995). En effet, les mécanismes de détoxification de l'organisme aboutissent, dans certains cas, à une transformation parfois très rapide des toxiques, ce qui rend leur détection impossible. Moore *et al.* (1994) citent le cas des hydrocarbures polycycliques chez le poisson, qui sont indétectables par les méthodes chimiques usuelles mais qui transformés, continuent à exercer leurs effets nocifs. De plus, les dérivés activés par les voies métaboliques sont parfois plus dangereux que la forme de base (intoxification). C'est le cas du parathion qui, transformé en paraoxon voit son pouvoir toxique multiplié par 1000 (Chambers et Chambers, 1990).

5- Les populations varient tant au niveau phénotypique qu'au niveau génotypique (Franke *et al.*, 1994; Depledge, 1994).

Les facteurs non biologiques

1- la variété des substances chimiques (Plus de 50.000 substances chimiques sont actuellement produites à l'échelle industrielle (Beasley, 1993)) rend impossible l'analyse au cas par cas tant des données chimiques que des données épidémiologiques.

2 - souvent, plusieurs substances coexistent sur un même site (Beasley, 1993, Mumtaz *et al.*, 1993). Des interactions toxicologiques peuvent

conduire à une réponse biologique différente quantitativement et/ou qualitativement de celle du composé isolé. Ces interactions peuvent se produire à divers niveaux physiologiques: absorption, pharmacocinétique, distribution, excrétion,... Si la toxicité globale du mélange est augmentée, on parle de synergie. Ainsi le risque de carcinogenèse pulmonaire lié à l'inhalation d'amiante est augmenté par la consommation de tabac (Casarett et Doull's Toxicology, 1986). Ces effets synergistiques sont en général sous estimés. Chez l'homme, il est important de tenir compte du fait que certains médicaments peuvent interagir avec les toxiques. Ainsi, le phénobarbital, connu pour ses effets inducteurs du cytochrome P-450 est susceptible d'influencer le métabolisme de certains toxiques comme les organophosphorés. De même, l'acétaminophène provoque une déplétion des réserves hépatiques de glutathion, et bloque toutes les réactions métaboliques nécessitant ce cofacteur.

Dans d'autres cas, le potentiel toxique est diminué (antagonisme des composés). Par exemple, l'ajout de tétrachlorocarbène, pourtant également hépatotoxique, à une même dose de dichlorobenzène, diminue de façon significative les lésions hépatiques induites par ce dernier composé (Mumtaz *et al.*, 1993). Il subsiste, donc, toujours une interrogation quant à la façon dont les différentes substances vont interagir.

3 - La durée de l'exposition influence la toxicité et ce facteur n'est pas toujours éclairci ni par les données épidémiologiques ni par les données de laboratoire puisqu'il est très difficile de tester l'effet d'expositions chroniques (Forbes et Forbes, 1994; Depledge, 1994).

4 - Les tests de toxicité en laboratoire observent souvent des réponses «tout ou rien» (toxicity tests endpoints). Par exemple, la DL50 mesure le taux de survie suite à l'exposition à une substance particulière. Or les effets toxiques ne se limitent bien souvent pas à une symptomatologie aiguë mais produisent le plus souvent des effets insidieux entraînant une détérioration progressive

de l'état de santé de l'organisme (Lovett Doust *et al.*, 1994).

5 - Le milieu environnant et les données climatologiques peuvent fausser l'évaluation (Depledge, 1994). En effet, certains toxiques (PCBs) sont présents sous forme de vapeur dans l'atmosphère et se redéposent sur le sol à l'occasion de précipitations. En période sèche, les dépôts seront donc moins importants. D'autre part, l'ensoleillement a une influence sur la toxicité de certaines substances. Par exemple, les dioxines sont très sensibles à la photooxydation et tous les facteurs limitant l'exposition aux rayons lumineux retardent leur élimination.

Tous ces facteurs justifient l'emploi d'autres méthodes d'investigation.

L'UTILISATION DES BIOINDICATEURS ET DES BIOMARQUEURS DANS L'ÉVALUATION DU RISQUE ENVIRONNEMENTAL

Les études écotoxicologiques recourent de plus en plus aux données biologiques basées sur le principe des animaux bioindicateurs et des biomarqueurs. Leur avantage est de permettre d'identifier et de quantifier les contaminants biodisponibles (Livingstone, 1993), de vérifier si l'exposition aux polluants a induit une réponse biologique et si cette réponse dépasse l'homéostasie, de voir si l'impact de la pollution touche les individus ou la population. Dans le cadre d'une réhabilitation d'un site, elles permettent d'en évaluer le succès ou d'en établir les priorités (Depledge et Fossi, 1994).

Les Bioindicateurs

Suivant les auteurs, le terme bioindicateur est utilisé selon deux acceptations. Pour certains (Melancon, 1995; Dmuchowski *et al.*, 1995; Kushlan, 1993), les bioindicateurs sont la réponse d'un organisme vivant et indiquent simplement l'**exposition** à un contaminant. Ils peuvent prédire un dommage éventuel et présentent les effets indésirables du toxique. Pour ces auteurs, les termes biomarqueurs et bioindicateurs sont utilisés de façon indifférente.

Pour d'autres (et c'est la définition que nous retiendrons également), ce sont des **êtres vivants**, tant animaux que végétaux, tant sauvages que domestiques utilisés pour l'étude de certaines conditions environnementales. Les résultats sont extrapolés à d'autres espèces où cette étude serait inconcevable, ou à l'environnement dans son ensemble (Zarski *et al.*, 1995; Beasley, 1993; O'Brien *et al.*, 1993).

D'autres termes sont parfois employés et définissent de façon plus précise le domaine d'application des bioindicateurs (O'Brien *et al.*, 1993):

- **Les (bio)moniteurs** sont des organismes chez lesquels l'étude de caractéristiques particulières (biomarqueurs) donne une mesure de la contamination environnementale. Les conclusions de cette étude peuvent être extrapolées à d'autres espèces ou à l'écosystème dans son ensemble.

- **Les sentinelles** sont des organismes chez lesquels l'étude de biomarqueurs donne un signal **précoce** de l'étendue de la contamination environnementale et son importance pour la santé humaine.

Les critères de sélection d'une espèce animale comme bioindicateur sont les suivants:

- les animaux doivent être en nombre relativement important (O'Brien *et al.*, 1993), géographiquement sédentaires, uniformément distribués, et les prélèvements doivent pouvoir se faire avec facilité.
- l'espèce doit être sensible au toxique en cause.
- la réponse au contaminant doit être relativement spécifique.
- la durée de vie de l'espèce est importante pour l'évaluation de l'impact d'expositions chroniques et de la variabilité de la réponse en fonction de l'âge
- la position dans la chaîne alimentaire intervient dans les phénomènes de biomagnification.
- les voies d'exposition aux toxiques: idéalement, quand les risques pour la santé humaine sont recherchés, une espèce soumise aux mêmes voies d'exposition doit être préférée. Si l'intoxication se fait par voie alimentaire, plusieurs possibilités existent:

- Le choix d'une espèce omnivore en raisons des préférences alimentaires humaines.

- Si l'exposition est liée à un type d'alimentation bien défini, il faut choisir une espèce qui consomme exclusivement cet aliment. Par exemple, si l'intoxication est liée à l'ingestion de poisson, des oiseaux piscivores peuvent être sélectionnés comme indicateurs

- On peut également rechercher des espèces consommées par l'homme.
 • la possibilité d'être élevées et de se reproduire en captivité peut être un facteur de décision.

Ces bioindicateurs peuvent être étudiés à différents niveaux, biochimiques, physiologiques ou comportementaux par le biais des biomarqueurs.

Les Biomarqueurs

L'Académie Nationale des Sciences (USA) (Depledge, 1994) les définit comme toute modification au niveau cellulaire ou biochimique, de structures, de mécanismes, ou de compositions, induite par des xénobiotiques et mesurable dans un système biologique ou dans des échantillons.

Une autre définition, plus adaptée aux biomarqueurs écotoxicologiques, a été proposée par Depledge (Depledge, 1994; Depledge et Fossi, 1994). Le biomarqueur écotoxicologique serait la réponse biologique (biochimique, cellulaire, physiologique ou comportementale) qui, dans les tissus, dans les liquides corporels ou au niveau d'un organisme dans son ensemble, donne une mesure **d'exposition** et/ou **d'effets toxiques** pour un ou de plusieurs polluants.

L'étude des biomarqueurs amène à situer l'organisme ou la population étudié sur une courbe de santé. En effet, le xénobiotique induit au niveau de l'organisme qui y est soumis un stress auquel correspond une réponse (Fig. 2) qui peut être

- homéostasique
- compensatoire
- ou non compensatoire suivant la charge en polluant.

Si la charge en polluant est modérée, l'exposition entraîne un affaiblissement mais les procédés d'homéosta-

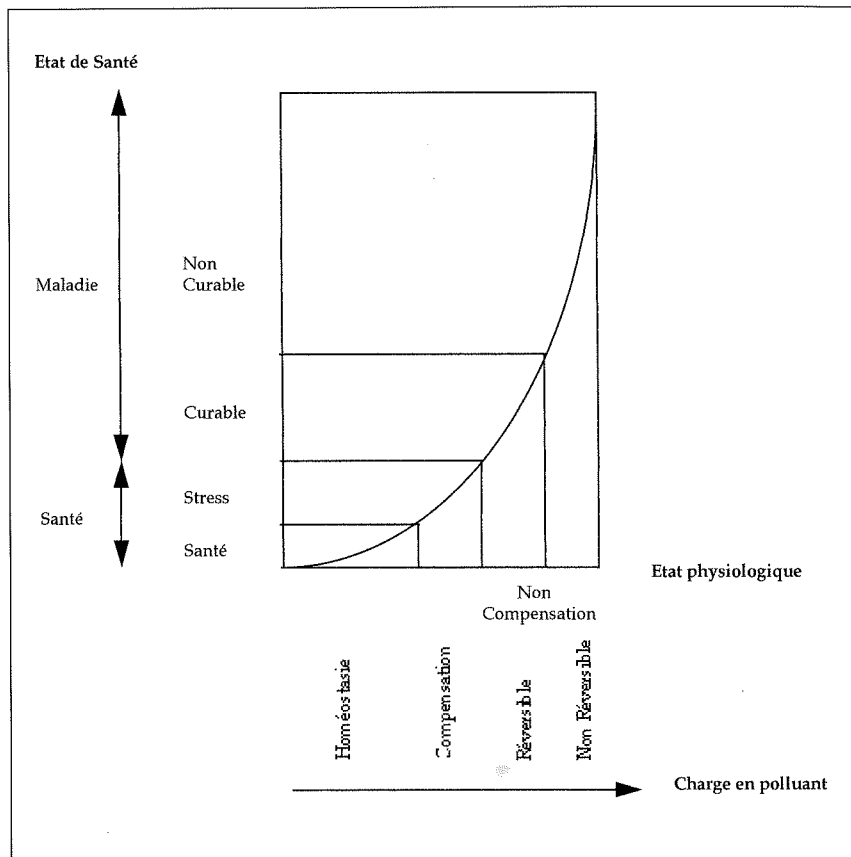


Figure 2
 L'état de santé en fonction du statut physiologique
 comme biomarqueur de l'exposition aux polluants
 (D'après Depledge, 1991)

sie assurent un ajustement suivi d'un retour à la normale quand le stress s'estompe. C'est l'homéostasie.

Si la charge en polluant est plus importante, des mécanismes physiologiques ou biochimiques se mettent en route pour permettre une détoxification ou une excrétion et garantir un fonctionnement sans handicap sérieux ou coûts trop importants. C'est la phase de compensation.

Au-delà d'une certaine charge, ces mécanismes ne suffisent plus: On entre dans une phase non compensée qui peut être réversible (maladie) ou non réversible (mort).

Les biomarqueurs se répartissent en 4 catégories:

- 1) **Biomarqueur d'exposition:** il dénonce l'exposition d'un organisme, d'une population, d'une communauté. Il est spécifique ou non.
- 2) **Biomarqueur d'effet:** il signale qu'un organisme, une population ou une communauté ont été affectés par un ou plusieurs polluants. Il ne

donne pas nécessairement d'information sur la nature du polluant. (ex: mesure de l'activité Mixed Function Oxidase, ensemble d'enzymes induits par la présence de certains xénobiotiques.)

3) **Biomarqueur d'exposition et d'effet:** il indique un degré d'exposition et lie l'exposition à un effet (ex: le taux d'inhibition des cholinestérases au niveau du cerveau marque une exposition aux organophosphorés et est en bonne corrélation avec les effets toxiques observés (Melancon, 1995)).

4) **Biomarqueur d'effets latents:** il signe l'exposition à un polluant qui limite les capacités de l'organisme à s'adapter pour survivre (ex: certains polluants induisent des troubles de la synthèse en vitamine A avec pour effet des troubles de la croissance).

Certains auteurs préfèrent une autre classification:

Biomarqueur fonctionnel: il annonce la mise en route de mécanismes de compensation ou de dé-

toxification induits par le polluant (ex: mesure de l'activité des MFO)

Biomarqueur non fonctionnel: il marque une modification biochimique ou physiologique qui ne change en rien la toxicité du polluant (taux d'inhibition des cholinestérases).

La liste des principaux biomarqueurs dont l'utilisation est reconvenue actuellement comme outil de monitoring est reprise dans le tableau 1. Les biomarqueurs dont l'utilisation est la plus large sont repris avec plus de détails.

Tableau 1
Biomarqueurs utilisés actuellement ou d'utilisation potentielle (D'après Melançon, 1995)

| |
|--|
| Adénosine triphosphate |
| ALAD (amino-acide- δ -lévulinatase déshydratase) |
| Anomalies du squelette |
| Chimie sanguine |
| Cytochrome P-450 (MFO) |
| Épaisseur de la coquille des oeufs |
| Enzymes de conjugaison |
| Estérases |
| Fonction immunitaire |
| Histopathologie |
| Hormones |
| Corticostéroïdes |
| Hormone de croissance |
| Insuline et Glucagon |
| Hormones sexuelles |
| Hormones thyroïdiennes |
| Métallothionéines |
| Modifications du DNA (méthylation des bases, cassures,...) |
| Porphyrines |
| Protéines de stress |
| Réserves d'énergie |
| Stress oxydatif |
| Synthèse de protéines (vitellogénine) |
| Taux de croissance |
| Teneur en vitamines A et C |

L'utilisation des biomarqueurs comme outil de monitoring de pollution doit obéir à plusieurs règles.

1) Validation du biomarqueur

- Le biomarqueur choisi doit être reproductible, quantifiable et pouvoir corrélé à un certain degré de déficience physiologique.
- La sensibilité et la spécificité des biomarqueurs est également un facteur primordial dans le choix des tests à effectuer. Certains réagissent de façon très précoce (comme le MFO) alors que d'autres, déterminant l'exposition aux xénobiotiques

à des niveaux plus élevés de l'organisation de l'écosystème réagissent plus lentement (index de population) (Figure 2).

- La durabilité de la réponse est également importante. Les biomarqueurs peuvent être répartis sur ce point en 4 catégories (Who Report, 1995):

1) Les biomarqueurs dont la 1/2 vie est de moins de 12h: par exemple, le dosage du taux de solvants dans le sang ou dans les alvéoles pulmonaires.

2) Les biomarqueurs avec une 1/2 vie comprise entre 12h et 100h: par exemple, le dosage de certains métabolites comme biomarqueurs de l'exposition à un toxique.

3) Les biomarqueurs dont la 1/2 vie est comprise entre 100h et 6 mois: certains adduits de DNA appartiennent à cette catégorie.

4) Les biomarqueurs dont la 1/2 vie est de plus de 6 mois.

- la relation entre le moment où l'exposition a eu lieu et la réponse du biomarqueur doit aussi être connue pour l'interprétation de certains résultats. En effet, parfois, une réponse est observée au niveau du biomarqueur alors que le dosage du polluant dans l'organisme est négatif.

- La connaissance de la pharmacocinétique est aussi essentielle pour déterminer la fréquence et la séquence des échantillonnages ainsi que pour interpréter les résultats obtenus sur le terrain en fonction de la relation dose/effet déterminée en laboratoire.

- Un certain «bruit de fond» peut se greffer sur la réponse des biomarqueurs. Des variations de réponse du biomarqueur peuvent apparaître indépendamment de l'exposition, chez un même individu ou entre les individus d'une même population. Cette variabilité intra/interindividuelle peut être liée à des facteurs extérieurs (température, disponibilité alimentaire,...) ou à des changements au niveau de la physiologie de l'individu (croissance, cycle œstral,...). Savoir reconnaître ce bruit de fond, qui est plus ou moins important suivant les biomarqueurs est essentiel pour interpréter les résultats (Fox, 1993; Peakall, 1992; Who Report, 1995).

2) Extrapolation de la réponse du biomarqueur à un niveau d'organisation plus élevé: l'individu ou la communauté

- Le dosage des biomarqueurs à un niveau individuel doit pouvoir servir de base à l'extrapolation du dommage pour l'organisme dans son ensemble et au stade suivant, pour la population et l'écosystème. La séquence d'évènements se succédant depuis la dérive du biomarqueur jusqu'au dommage proprement dit doit pouvoir être connue. Par exemple, l'inhibition de la δ -aminolévulinatase déshydratase par le plomb conduit à des défauts de synthèse de l'hème et une diminution de la population y est étroitement liée. La diminution de l'épaisseur de la coquille de l'œuf chez les faucons suite à l'exposition au DDE, cause des pertes importantes d'embryons (bris de l'œuf) et donc menace la survie de l'espèce (Peakall, 1992). Par contre, pour d'autres biomarqueurs, la relation entre le biomarqueur et le dommage éventuel est moins précise: l'induction du système MFO, s'il signale bien l'exposition à un polluant et la mise en route de mécanismes de détoxification, ne donne aucune indication sur le dommage qui peut être encouru. De même, les altérations du DNA sont un indicateur très sensible d'exposition, mais les processus de réparation sont tels qu'un dommage n'apparaîtra pas forcément (Peakall, 1992; Shugart, 1994).

- Une hiérarchie dans l'utilisation des biomarqueurs existe. Elle provient de plusieurs facteurs: la spécificité, le moment d'apparition de la réponse par rapport à l'exposition et le niveau d'organisation biotique auquel cette réponse intervient (figure 3).

- L'utilisation d'une batterie de biomarqueurs est à préconiser dans tous les cas. Une batterie de plusieurs biomarqueurs présente de multiples avantages:

- le moment où ils interviennent sur la courbe de santé de l'organisme et la durée de leur réponse doivent différer. Ainsi, Depledge, 1994 conseille l'utilisation de 5 biomarqueurs. De cette manière, l'estimation du risque est définie avec plus de précisions.
- Les biomarqueurs de la batterie doivent intervenir à des niveaux d'organisations différents (tableau 2)

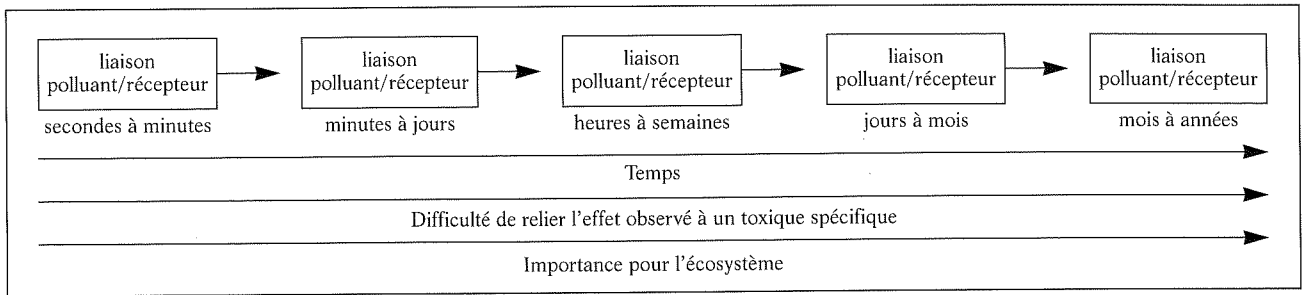


Figure 3

Liens entre les réponses biochimiques, physiologiques, observées au niveau de l'individu ou au niveau de la population et l'exposition au polluant (D'après Peakall, 1992)

Tableau 2
Niveaux d'organisation biotique et biomarqueurs possibles pour ces différents niveaux dans les colonies d'oiseaux aquatiques (D'après Kushlan, 1993).

| Niveau d'organisation | Biomarqueurs disponibles |
|--------------------------|--|
| suborganique | adduits de DNA méthylation du DNA sister chromatid exchange contenu en DNA dosage de l'activité MFO induction de l'activité métallothionéine accumulation du contaminant qualité de la coquille de l'œuf fonction thyroïdienne activité des estérases inhibition de l'alad accumulation de rétinoïdes biosynthèse de l'hème hématologie histopathologie tératologie |
| Organisme | croissance comportement capacités à se reproduire taux de mortalité |
| Population | présence/absence distribution indices de population |
| Communauté Ecosystème | bioindicateurs de communauté bioindicateurs d'écosystème |

- Les biomarqueurs doivent idéalement vérifier les fonctions de plusieurs organes.

Les principaux biomarqueurs

Les protéines de stress définissent une série de protéines dont la synthèse est induite par certains agents chimiques (arsenic, métaux lourds (Melancon, 1995), par certains agents biologiques (virus) (Melancon, 1995)) comme aussi par certaines conditions physiques (choc thermique) (Fossi *et al.*, 1994; Melancon, 1995). Certaines paraissent jouer un rôle dans la protection de l'organisme face à des perturbations environnementales. Elles sont généralement considérées comme non spécifiques. Elles ont été étu-

diées plus particulièrement dans des expériences de laboratoire utilisant des mammifères, des invertébrés ou des cultures cellulaires. Leur utilisation sur le terrain n'a pas encore été développée (Melancon, 1995)

Le dosage de l'activité enzymatique de certains systèmes de détoxification de l'organisme est utilisé largement comme monitoring de pollution (Burgeot *et al.*, 1994, Fossi *et al.*, 1991; Fossi *et al.*, 1992)

Face à l'introduction de xénobiotiques, l'organisme a réagi en adaptant une chaîne d'enzymes responsables de la transformation de substances endogènes: les MFO (mixed function oxidases). Cet ensemble d'enzymes comprenant la superfamille du cytochrome P-450

et une flavoprotéine (NADPH-réductase) intervient dans les mécanismes de détoxification des substances lipophiles et permet selon une séquence comprenant deux étapes, la transformation du composé en substance polaire puis son excrétion après conjugaison à des sucres, sulfates, phosphates (Kushlan, 1993; Melancon, 1995; Fossi *et al.*, 1994)... Il faut remarquer que dans certains cas, la transformation d'un polluant par le système MFO conduit à la formation de composés au pouvoir toxique exacerbé (ex: la transformation des hydrocarbures polycycliques par le MFO produit des époxydes à potentiel carcinogène).

La répartition de ces enzymes varie suivant les espèces animales et suivant les organes (foie, poumon, peau). De nombreux xénobiotiques (biphényles polychlorés (PCBs), dioxines, biphényles polychlorés (PBBs), hydrocarbures polycycliques (PAHs)) sont susceptibles d'induire ou d'influencer leur activité enzymatique et cette mesure constitue un biomarqueur d'exposition très sensible et très précoce.

Les mesures d'inhibition d'enzymes spécifiques:

Les estérases: Les estérases omniprésentes dans l'organisme sont classiquement réparties en 2 groupes (Aldridge, 1953): les A-estérases, responsables de la dégradation des organophosphorés et les B-estérases, comprenant les cholinestérases (butyryl et acetyl), les carboxylestérases et les estérases neurotoxiques (NTE). Elles sont inhibées de façon spécifique par les organophosphorés et les carbamates. Ce mécanisme d'action a été mis à

profit pour développer l'étude d'un marqueur d'exposition tout à fait spécifique. Le dosage de l'activité des B-estérases peut se faire au niveau du plasma, du sérum et de différents organes tels que le poumon (Lessire *et al.*, 1996), le cerveau (Yawets *et al.*, 1978; Hoffman et Eastin, 1981) et le foie (Fossi *et al.*, 1994; Chambers et Chambers, 1991) chez les poissons (Dunier *et al.*, 1991), les oiseaux (Fossi *et al.*, 1994; Yawets *et al.*, 1978; Hoffman et Eastin, 1981) ou chez les mammifères (Chambers et Chambers, 1991, Lessire *et al.*, 1996; Halbrook *et al.*, 1992). D'autre part, les organophosphorés induisant également dans certaines conditions une toxicité nerveuse (delayed neurotoxicity), l'activité de la NTE (neurotoxic esterase) peut être dosée également comme biomarqueur d'exposition et d'effet.

Dosage de l'activité ALAD: l'inhibition de l'activité de la δ -aminolévulinate déshydratase est étudiée dans le sang comme biomarqueur hautement spécifique de l'intoxication au plomb (Dieter et Finley, 1979). Cette enzyme intervient dans les mécanismes de synthèse de la protéine hémique, constituant de l'hémoglobine et d'autres protéines telles que le cytochrome P-450.

Dosage du taux de métallothionéines: Les métallothionéines font partie d'un ensemble de protéines capables de fixer les métaux. Leur synthèse est induite par l'exposition à plusieurs métaux lourds tels que le cadmium, le cuivre, le mercure, le zinc, le cobalt, le bismuth et le nickel (Holdway *et al.*, 1995; Melancon, 1995). D'autres agents de stress peuvent également stimuler leur production.

L'exposition aux polluants peut altérer des processus métaboliques et produire des résidus dosables tels que les porphyrines

La synthèse de l'hémoglobine peut être perturbée sous l'influence de PCBs (Melancon, 1995; Fossi *et al.*, 1994) et de certains métaux lourds (Fossi *et al.*, 1994) se traduisant par l'accumulation de produits intermédiaires de son métabolisme. Le dosage des porphyrines a fait l'objet d'études dans le foie, le sang, les

urines ou les fèces (Leonzio *et al.*, 1996)

Modifications des processus de synthèse ou de transport de vitamines ou d'hormones

De nombreuses études ont mis en évidence l'effet négatif des contaminants tels que les PCBs et les dioxines (TCDD et TCDF) sur les réserves en vitamine A. Ces substances agiraient au niveau des protéines de transport communes à la vitamine A et aux hormones thyroïdiennes et au niveau du métabolisme de la vitamine. Pour cette raison, les dysfonctions au niveau thyroïdien sont souvent accompagnées de carence en vitamine A. Le taux de rétinoïdes dans le sang peut indiquer une carence en vitamine A et être utilisé comme biomarqueur. Quant à l'effet des PHAHs (hydrocarbures aromatiques polyhalogénés) sur la fonction thyroïdienne, il a été mis en évidence sur plusieurs espèces d'oiseaux et de poissons. Il se traduit par des variations du taux d'hormones T3 et T4 et par l'apparition de goître, objectivée par une augmentation du poids de la glande et par des coupes histopathologiques.

Altérations du DNA: L'attaque du matériel génétique par les polluants peut se traduire par une cascade d'évènements produisant d'abord un dommage structurel du DNA, la production de mutations et enfin l'expression de ces mutations (apparition de tumeurs, malformations embryonnaires). Les différentes étapes de ce processus peuvent servir de biomarqueurs. (Peakall, 1992; Fossi *et al.*, 1994)

La première de celles-ci est la détection des adduits. Les adduits sont le résultat d'une liaison covalente du toxique (les PAHs) avec le brin de DNA. Au stade suivant, l'exposition à la substance chimique peut provoquer des cassures du DNA (strand breakage) par affaiblissement des ponts d'hydrogènes liant les deux structures hélicoïdales du brin de DNA, des changements dans la composition (taux de méthylation et d'oxydation) et des augmentations du taux de réparation du DNA. Au troisième stade, les mutations du DNA

sont acquises et se transmettent dans le matériel génétique, le taux d'aberrations chromosomique est observé et notamment le sister chromatid exchange (SCE). Les dommages observés peuvent se marquer sur l'individu lui-même (cancer) ou sur sa descendance (anomalies congénitales)

Modification du système immunitaire: De nombreux xénobiotiques entraînent des dépressions de la fonction immunitaire de l'organisme. Ces troubles peuvent se manifester tant au niveau de l'immunité humorale (dosage des anticorps) ou cellulaire (dosage des macrophages et de leur activité). La résistance de l'organisme aux infections peut également être testée (Melancon, 1995).

Troubles de la reproduction: Plusieurs paramètres peuvent être évalués: le taux de fertilité, le taux de fécondité, le taux de mortalité et de morbidité des embryons, le taux d'éclosion, le taux de survie dans la nichée...

Dérèglement de la fonction des tissus ou des organes mis en évidence par des tests fonctionnels ou des analyses histopathologiques.

Mauvaise croissance, modification de l'aptitude à se développer, perte de poids.

Anomalies du squelette. Ils signent les effets d'une exposition aux xénobiotiques à une échelle d'organisation biologique plus élevée (échelle de population).

Modification de l'épaisseur de la coquille de l'œuf: Utilisé actuellement comme biomarqueur d'exposition, ce paramètre a été découvert de façon fortuite, lors de l'analyse des causes provoquant une chute des populations d'oiseaux rapaces aux Etats-Unis et en Grande Bretagne. Les chercheurs ont réussi à retracer la séquence d'évènements se succédant depuis l'exposition au DDE, un métabolite stable du DDT, jusqu'à l'amincissement des parois de l'œuf, les bris d'œufs plus importants et enfin la chute du nombre d'éclosions (Peakall, 1992; Kushlan, 1993). Relativement spécifique, ce paramètre peut subir l'influence d'autres facteurs de stress: température, ré-

Tableau 3
Biomarqueurs utilisés pour le monitoring environnemental :
mode de prélèvement et indications (d'après Fossi *et al.*, 1994).

| Biomarqueurs | Polluants | Technique invasive | Technique non invasive | Spécificité |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------|------------------------|-------------|
| Estérases | OPs Carbamates | Cerveau | Sang | + ++ |
| Porphyrines | Métaux lourds PAHs | Foie | Sang, fèces | ++ |
| MFO | PAHs, PHAHs | Foie | Peau, muqueuses | |
| Biochimie sanguine | Métaux lourds PHAHs, OPs | | Sang | |
| Rétinols | PHAHs | Foie | Sang | |
| Fonction thyroïdienne | PHAHs | Foie | Sang | |
| ALAD | Métaux lourds | | Sang | +++ |
| Fonction immunitaire | Métaux lourds PHAHs, PAHs OPs | Lymphocytes | Sang | |
| Adduits Hb | PHAHs, PAHs | | Sang | |
| Protéines de stress | Métaux lourds PHAHs | | Sang | |
| DNA : Adduits | PAHs, PHAHs | Plusieurs tissus | Sang, peau | |
| SCE | PAHs, PHAHs | Plusieurs tissus | Sang | + |
| Cassure | PAHs, PHAHs | Plusieurs tissus | Sang, peau | |

OPs : organoposphorés, PAHs : hydrocarbures polyaromatiques, PHAHs : hydrocarbures polyaromatiques polyhalogénés, Hb : hémoglobine, SCE : sister chromatid exchange, + : relativement non spécifique, ++ : modérément spécifique, +++ : hautement spécifique.

gime alimentaire, exposition aux métaux. Des méthodes d'estimation non destructrices ont été mises au point (Kushlan, 1993), ce qui rend l'étude de ce biomarqueur encore plus intéressante.

Le tableau 3 présente les types de contaminants susceptibles de provoquer une dérive d'un de ces biomarqueurs, la spécificité de ceux-ci et le type de prélèvements à envisager.

CONCLUSION

En conclusion, l'évaluation du risque écologique par les techniques de biomarqueurs est en pleine évolution. Certains biomarqueurs sont d'ores et déjà pleinement validés et leur emploi reconnu. D'autres sont en développement et leur utilisation en routine nécessite encore des mises au point. S'il s'agit bien d'un outil en pleine extension, il faut en connaître les limites et bien positionner le problème dans son ensemble, intégrer les différents paramètres de variation pour tirer le maximum de renseignements de l'analyse des données fournies.

SUMMARY

biomarkers and bioindicators in vertebrates: importance in evaluation of quality of an ecosystem

Environment becomes more and more a great preoccupation for population but also for politic and scientific instances. Evaluation of its quality or damage must follow a well-established procedure. This review develops the different aspects of this procedure of evaluation and demonstrates its limits. In a second part, alternative predictive tools of environmental quality or damage are explained: biomarkers and bioindicators. Main indications of these biological tools are reviewed. Some biomarkers are described.

BIBLIOGRAPHIE

- ALDRIDGE, W. N. Serum esterases. 1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate nad butyrate, and a method for their determination. *Biochem.J.*, 1953, **53**, 110-117.
- ANSAY, M. La chaîne alimentaire en Toxicologie, quelques exemples, quelques problèmes. *Ann. Méd. Vét.* 1994, **138**, 347-351.
- BEASLEY, V. Ecotoxicology and Ecosystem health: Roles for veterinarians Goals of the Envirovet program. *J.A.V.M.A.*, 1993, **203**(5) 617-627.
- BENKE, G.M. AND MURPHY, S.D. The influence of age on the toxicity and metabolism of methyl parathion and parathion in male and female rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1975, **13**, 254-269.
- BURGEOT, T., BOCQUENE, G., PINGRAY, G., GODEFROY, D., LEGRAND, J., DIMEET, J., MARCO, F., VINCENT, F., HENOCQUE, Y., OGER JEANNERET, H., AND GALGANI, F. Monitoring biological effects of contamination in marine fish along french coasts by measurement of ethoxyresorufin-O-deethylase activity. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 1994, **29**, 131-147.
- CASARETT AND DOUL'S TOXICOLOGY, THE BASIC SCIENCE OF POISON, Mac Millan Publishing company, Toronto, 1986.
- CHAMBERS, J. E. AND CHAMBERS, H. W. Time course of inhibition of acetylcholinesterase and aliesterases following parathion and paraoxon exposure in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1990, **103**, 420-429.
- CHASE, L.A., STUDIER, E.H., AND THORISSON, S. Aspects of nitrogen and mineral nutrition in icelandic reindeer, rangifer tarandus. *Comp. Biochem. Physiol.* 1994, 109A, 63-73.
- CRASTE, L. AND BURGAT-SACAZE, V. Les cervidés sauvages bioindicateurs de pollution par le cadmium. *Revue Méd. Vét.*, 1995, **146**, 8-9, 583-592.
- DEPLEDGE, M. H., AND FOSSI, M. C. The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. *Ecotoxicology*, 1994, **3**, 161-172.

- DEPLEDGE, M. H. The rational basis for the use of biomarkers as ecological tools. in Non destructive biomarkers in vertebrates, FOSSI, M.C., AND LEONZIO, C., Lewis Publishers, Florida, p. 271-295, 1994.
- DE SNOO, G.R., CANTERS, K.J., DE JONG, F. M. W. AND CUPERUS R. Integral hazard assessment of side effects of pesticides in the Netherlands-A proposal. *Env. Toxicol. Chem.*, 1994, 13(8) 1331-1340.
- DIETER, M. P. AND FINLEY, M. T. D-aminolevulinic acid dehydratase enzyme activity in blood, brain, and liver of lead-dosed ducks. *Env. Res.*, 1979, 19, 127-135.
- DMUCHOWSKI, W., AND BYTNEROWCZ, A. Monitoring environmental pollution in Poland by chemical analysis of scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles. *Env. Poll.*, 1995, 87, 87-104.
- DUNIER, M., SIWICKI, A.K., AND DEMAEL, A. Effects of organophosphorus insecticides: Effects of trichlorfon and dichlorvos on the immune response of carp (*Cyprinus carpio*) *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 1991, 22, 79-87.
- FITZNER, R.E., RICKARD, W.H., AND HINDS W.T. Excrement from Heron colonies for environmental assessment of toxic elements. *Environmental Monitoring and Assessment*, 1982, 1, 383-386.
- FORBES, V.E., AND FORBES, T.L. Ecotoxicology in theory and practice, Chapman and Hall ed., London, 1994.
- FOSSI, M.C., LEONZIO, C., DI SCIARA, FOCARDI, S., LARI, L. AND RENZONI, A. Modulation of mixed function oxidase activity in black headed gulls living in anthropic environments: Biochemical acclimatization or adaptation? *Environ. Toxicol. Chem.*, 1991, 10, 1179-1188.
- FOSSI, M.C., MARSILI, L., LEONZIO, C., DI SCIARA, G. N., ZANARDELLI, M., AND FOCARDI, S. The use of non destructive biomarker in mediterranean cetaceans: Preliminary data on MFO activity in skin biopsy. *Mar. Poll. Bull.* 1992, 24(9) 459-461.
- FOSSI, M.C., MASSI, A., AND LEONZIO, C. Blood esterase inhibition in birds as an index of organophosphorus contamination: field and laboratory studies. *Ecotox.* 1994, 3, 11-20.
- FOSSI, M.C., AND LEONZIO, C. Non destructive biomarkers in vertebrates, Lewis Publishers, Florida, 1994.
- FOX, G.A. What have biomarkers told us about the effects of contaminants on the health of fish eating birds in the Great Lakes? The theory and a literature review. *J. Great Lakes Res.*, 1993, 19(4) 722-736.
- FRANKE, C., STUDINGER, G., BERGER, G., BOHLING, S., BRUCKMAN, U., COHORS- FRESENBORG, D. AND JÖNCKE, U. The assessment of bioaccumulation *Chemosphere*, 1994, 29 (7) 1501-1514.
- HALBROOK, R.S., SHUGART, L.R., WATSON, A.P., MUNRO, N.B., AND LINNABARY, R. D. Characterizing biological variability in livestock blood cholinesterase activity for biomonitoring organophosphate nerve agent exposure. *J.A.V.M.A.*, 1992, 201(5), 714-725.
- HOFFMAN, D. J. AND EASTIN, W.C. Jr. Effects of malathion, diazinon and parathion on mallard embryo development and cholinesterase activity. *Envir. Res.*, 1981, 26, 472-485.
- HOFFMAN, D. J., RATTNER, B.A., BURTON, G.A. Jr AND CAIRNS J.Jr. Handbook of ecotoxicology p. 667-716. Lewis Publishers, Florida, 1995.
- HOLDWAY, D.A., BRENNAN, S.E., AND AHOKAS, J.T. Short review of selected fish biomarkers of xenobiotic exposure with an example using fish hepatic mixed function oxidase. *Aust.J. Ecology.* 1995, 20, 34-44.
- KUSHLAN, J.A. Colonial waterbirds as bioindicators of environmental change. *Colonial Waterbirds.*, 1993, 16(2) 225-251.
- LEONZIO, C., FOSSI, M. C. AND CASINI, S. Porphyrins as biomarkers of methylmercury and PCB exposure in experimental quail. *Bull. Env. Contam. Toxicol.* 1996, 56, 244-250.
- LESSIRE, F., GUSTIN, P., DELAUNOIS, A., BLODEN, S., NEMMAR, A., VARGAS, M., AND ANSAY, M. Relationship between parathion and paraoxon toxicokinetics, lung metabolic activity, and cholinesterase inhibition in guinea pig and rabbit lung. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1996, 138, 201-210.
- LIVINGSTONE, D. R. Biotechnology and pollution monitoring : use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J.Chem. Tech. Biotechnol.* 1993, 57, 195-211.
- LLOYD, O.L., LLOYD, M.M., WILLIAMS, F.L.R., Mc KENZIE, A., AND HAY, A. Toxicity from ragwort and fat cow syndrome or from industrial chemicals: the value of epidemiological analysis for interpreting clinico-pathological findings. *Sci. Total Environ.* 1991, 106, 83-96.
- LOVETT DOUST, J., SCHMIDT, M. AND LOVETT DOUST, L. Biological assessment of aquatic pollution: a review, with emphasis on plants as biomonitors. *Biol. Rev.* 1994, 69, 147-186.
- MELANCON, M. J. Bioindicators used in aquatic and terrestrial monitoring p.220-240 in Handbook of Ecotoxicology, HOFFMAN, D. J., RATTNER, B.A., BURTON, G.A. Jr AND CAIRNS J.Jr., Lewis Publishers, Florida, 1995
- MOORE, M. N., KÖHLER, A., LOWE, D.M. AND SIMPSON, M.G. An integrated approach to cellular biomarkers in fish in Non destructive biomarkers in vertebrates, FOSSI, M.C., AND LEONZIO, C., p171-215, Lewis Publishers, Florida, 1994.
- MUMTAZ, M. M., SIPES, I. G., CLEWELL, H.J., AND YANG, R.S.H. Risk assessment of chemical mixtures: biologic and toxicologic issues. *Fund. Appl. Toxicol.* 1993, 21, 258-269.
- MUNDA, G., NIJKAMP, P., AND RIETVELD, P. Qualitative multicriteria evaluation for environmental management, *Ecol. Econ.*, 1994, 10, 97-112.
- O'BRIEN, D.J., KANEENE, J.B., AND POPPENGA, R.H. The use of mammals as sentinels for human exposure to toxic contaminants in the environment. *Environ. Health Perspect.* 1993, 99, 351-368.
- PEAKALL, D. Animals biomarkers as pollution indicators, p. 201-226, Chapman and Hall Ed., London, 1992.
- RAMADE, F., Ecotoxicologie, Masson Editeur, Paris, 1977.
- SHUGART, L. Genotoxic Responses in blood in Non destructive biomarkers in vertebrates, FOSSI, M.C., AND LEONZIO, C., Lewis Publishers, Florida, p. 131-146, 1994.
- WALTNER-TOEWS, D., AND MAC EWEN, S. Residues of industrial chemicals and metallic compounds in food of animal origin: a risk assessment. *Prev. Vet. Med.*, 1994, 20, 201-218.
- WHO REGIONAL OFFICE FOR EUROPE, Guiding principles for the use of biological markers in the assessment of human exposure to environmental factors: an integrative approach of epidemiology and toxicology, *Toxicology*, 1995, 101, 1-10
- ZARSKI, T.P., DEBSKI, B., ROKICKI, E., SAMEK, M., VALKA, J. AND BESEDA, I. Free living animals as bioindicators of mercury pollution. *Ekologia*, 1995, 14(2), 113-117.