
**Qualité de l'eau — Mesurages
biochimiques et physiologiques
sur poisson —**

**Partie 2:
Dosage de
l'éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD)**

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

*Water quality — Biochemical and physiological measurements on
fish —*

Part 2: Determination of ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/730eff44-462e-45a2-b0ba-0c7f8fcef886/iso-ts-23893-2-2007>



PDF – Exonération de responsabilité

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO/TS 23893-2:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/730eff44-462e-45a2-b0ba-0c7f8fce886/iso-ts-23893-2-2007)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/730eff44-462e-45a2-b0ba-0c7f8fce886/iso-ts-23893-2-2007>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2007

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax. + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
Introduction	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Principe	1
4 Environnement d'essai	1
5 Réactifs	2
6 Appareillage	3
7 Échantillonnage et préparation des échantillons	4
7.1 Échantillonnage des poissons	4
7.2 Mise à mort des poissons et dissection	4
7.3 Conservation	4
8 Mode opératoire	5
8.1 Préparation des fractions	5
8.2 Dosage des protéines	5
8.3 Dosage de l'activité EROD	5
8.4 Vérification de la sensibilité du réactif biologique et de la conformité du mode opératoire	7
9 Expression des résultats	7
9.1 Calcul de l'activité EROD	7
9.2 Traitement statistique des données	8
10 Rapport d'essai	8
Annexe A (informative) Exemples de résultats	9
Bibliographie	14

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

Dans d'autres circonstances, en particulier lorsqu'il existe une demande urgente du marché, un comité technique peut décider de publier d'autres types de documents normatifs:

- une Spécification publiquement disponible ISO (ISO/PAS) représente un accord entre les experts dans un groupe de travail ISO et est acceptée pour publication si elle est approuvée par plus de 50 % des membres votants du comité dont relève le groupe de travail;
- une Spécification technique ISO (ISO/TS) représente un accord entre les membres d'un comité technique et est acceptée pour publication si elle est approuvée par 2/3 des membres votants du comité.

Une ISO/PAS ou ISO/TS fait l'objet d'un examen après trois ans afin de décider si elle est confirmée pour trois nouvelles années, révisée pour devenir une Norme internationale, ou annulée. Lorsqu'une ISO/PAS ou ISO/TS a été confirmée, elle fait l'objet d'un nouvel examen après trois ans qui décidera soit de sa transformation en Norme internationale soit de son annulation.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO/TS 23893 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 5, *Méthodes biologiques*.

L'ISO 23893 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Qualité de l'eau — Mesurages biochimiques et physiologiques sur poisson*:

- *Partie 1: Échantillonnage des poissons, manipulation et conservation des échantillons*
- *Partie 2: Dosage de l'éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD) [Spécification technique]*

Introduction

Le mesurage des marqueurs biologiques de la pollution dans les poissons, tel que le mesurage des activités enzymatiques de biotransformation, fournit vraisemblablement des informations sur les niveaux d'exposition, sur la biodisponibilité et sur les effets biologiques précoces des substances présentes dans les écosystèmes aquatiques. Le mesurage de l'activité enzymatique de l'EROD permet de réaliser un diagnostic de l'exposition des poissons aux inducteurs du cytochrome P450 1A, tels que certains biphényles polychlorés (PCB), hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), dioxines, etc. Une grande quantité de travaux de recherche témoigne de l'importance des études menées (voir Bibliographie).

L'induction de l'activité EROD traduit la présence d'inducteurs tels que ceux mentionnés ci-dessus. D'un autre côté, l'absence d'induction ne démontre pas nécessairement que les poissons n'ont pas été exposés à des contaminants organiques, en considérant les phénomènes d'inhibition de l'induction de l'EROD d'une modification possible de la biodisponibilité des inducteurs ou l'exposition à de faibles concentrations.

L'application d'une méthode de référence normalisée est fortement conseillée dans un programme de surveillance. Les exercices d'interétalonnage sur le mesurage de l'activité enzymatique de l'EROD entrepris depuis 1991 ont révélé de nombreuses sources d'erreurs très faciles à éviter (dilution de la résorufine, dosage des protéines, calcul de l'activité enzymatique, etc.) une fois que les laboratoires se sont familiarisés avec l'analyse des activités enzymatiques et les facteurs d'erreur possibles.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO/TS 23893-2:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/730eff44-462e-45a2-b0ba-0c7f8fcef886/iso-ts-23893-2-2007)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/730eff44-462e-45a2-b0ba-0c7f8fcef886/iso-ts-23893-2-2007>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO/TS 23893-2:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/730eff44-462e-45a2-b0ba-0c7f8fce886/iso-ts-23893-2-2007)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/730eff44-462e-45a2-b0ba-0c7f8fce886/iso-ts-23893-2-2007>

Qualité de l'eau — Mesurages biochimiques et physiologiques sur poisson —

Partie 2: Dosage de l'éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD)

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 23893 spécifie une méthode pour mesurer l'activité enzymatique de l'éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD) sur une fraction post-mitochondriale du broyat du foie de poisson (fraction subcellulaire dans laquelle l'activité EROD est localisée) en employant une méthode d'analyse fluorimétrique avec une cuve ou des microplaques.

Elle s'applique aux poissons prélevés dans leur environnement naturel (eau douce ou eau salée) ou aux poissons exposés à des substances ou effluents dans un laboratoire.

Cette méthode est applicable pour les valeurs de l'EROD supérieures ou égales à 1 pmol/(min·mg) de protéines. Une sensibilité plus élevée peut être obtenue en utilisant un mode opératoire employant une cuve (tube à essai).

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/730eff44-462e-45a2-b0ba-0c7f8fcef886/iso-ts-23893-2-2007>

2 Références normatives

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 23893-1, *Qualité de l'eau — Mesurages biochimiques et physiologiques sur poisson — Partie 1: Échantillonnage des poissons, manipulation et conservation des échantillons*

3 Principe

Les échantillons de poissons sont prélevés et disséqués tel que décrit dans l'ISO 23893-1 pour obtenir des morceaux de foie. Des broyats de foie de poisson sont préparés (homogénéisation) et le surnageant (fraction S9) est récupéré par centrifugation. L'activité enzymatique de l'EROD dans les fractions S9 est dosée en mesurant l'augmentation de la fluorescence due à la transformation de la 7-éthoxyrésorufine en résorufine. La fluorescence est rapportée en quantités de résorufine à l'aide d'une gamme étalon (étalonnage externe de résorufine ou de rhodamine B). L'activité EROD est reliée à la quantité de protéines de la fraction S9.

4 Environnement d'essai

Tous les essais et les opérations de manipulation avec la fraction S9 doivent être réalisés à une température proche de 4 °C (par exemple manipulation dans de la glace pilée), à l'exception de la réaction enzymatique, qui doit être réalisée à 20 °C ± 2 °C.

5 Réactifs

Sauf indications contraires, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue.

5.1 Eau ultra pure, de conductivité inférieure à 1 µS/cm.

5.2 Chlorure de potassium, solution de 150 mmol/l.

Dissoudre 11,2 g de KCl (masse moléculaire relative de 74,6) dans 1 l d'eau (5.1). Cette solution est stable durant six mois à une température de 4 °C ± 3 °C.

5.3 Tampon phosphate, 100 mmol/l; pH 7,8 ± 0,1.

La composition ionique et le pH peuvent affecter l'activité EROD et les conditions optimales peuvent varier selon les espèces. Le tampon suivant doit fournir des valeurs mesurables et comparables de l'activité EROD pour la plupart des espèces de poissons.

Préparer les deux solutions suivantes, A et B:

— Solution A: dissoudre 17,4 g de K₂HPO₄ (masse moléculaire relative de 174,2) dans 1 l d'eau (5.1);

— Solution B: dissoudre 13,6 g de KH₂PO₄ (masse moléculaire relative de 136,1) dans 1 l d'eau (5.1).

Ajuster le pH de la solution A à 7,8 ± 0,1 avec la solution B.

Cette solution est stable durant six mois à une température de 4 °C ± 3 °C.

5.4 Glycérol (20 %) dans la solution tampon phosphate.

Ajouter une fraction massique de 20 % de glycérol (C₃H₈O₃; masse moléculaire relative de 92,1) au tampon phosphate (5.3). Les concentrations finales sont ensuite de 20 % de glycérol et 100 mmol/l de phosphate.

5.5 Solution mère de résorufine (108 mg/l).

Dissoudre 10,8 mg de résorufine (sel de sodium C₁₂H₆NNaO₃; masse moléculaire relative de 235,17) dans 100 ml de diméthylsulfoxyde (DMSO) à l'abri de la lumière et en agitant durant 2 h. Lire la densité optique à 572 nm sur le spectrophotomètre. Calculer la concentration exacte de résorufine, *c*, en millimoles par litre, en utilisant l'Équation (1):

$$c = \frac{D}{\varepsilon l} \quad (1)$$

où

D est la densité optique (correspondant au nombre d'onde de l'absorbance, en cm⁻¹);

ε est le coefficient d'extinction molaire {pour la résorufine, des valeurs de *ε* = 73,2 (mmol/l)⁻¹·cm⁻¹ à 572 nm (voir Référence [17]) et 54,0 ± 1,1 mmol cm⁻¹ (voir Référence [36]) ont été consignées};

l est la longueur du chemin optique, en centimètres.

Préparer cette solution au moment du dosage et conserver des aliquotes de cette solution congelées à -20 °C à l'abri de la lumière. Ces aliquotes peuvent être conservées durant six mois.

NOTE La résorufine est très instable lorsqu'elle est exposée à la lumière du jour.

5.6 Solution préparée de résorufine.

Diluer la solution mère (5.5) avec du diméthylsulfoxyde (DMSO) de manière à obtenir environ 10 ml de la solution préparée 11,5 µmol/l. Préparer cette solution au moment du dosage.

5.7 Solution témoin de rhodamine B.

Dissoudre 25 mg de rhodamine B (C₂₈H₃₀N₂O₃; masse moléculaire relative de 442,55) dans 250 ml d'éthylène glycol monométhyl éther. Diluer cette solution avec de l'éthylène glycol monométhyl éther de manière à obtenir une solution étalon de 0,1 µmol/l à conserver sous forme d'aliquotes. Cette solution demeure stable durant six mois à l'abri de la lumière et à une température de 4 °C ± 3 °C.

5.8 Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH).

Pour la méthode avec microplaque, dissoudre 19,2 mg de β-NADPH (C₂₁H₂₆N₇Na₄O₁₇P₃; masse moléculaire relative de 833,35) dans 2 ml d'eau (5.1) pour obtenir 10 mmol/l.

Préparer cette solution au moment du dosage et la maintenir à l'abri de la lumière dans de la glace.

NOTE Pour la méthode employant une cuve (tube à essai), 41,7 mg de NADPH sont dissous dans 1 ml d'eau (5.1) pour obtenir 50 mmol/l.

5.9 Solution mère de 7-éthoxyrésorufine.

Préparer une solution mère de 7-éthoxyrésorufine concentrée (C₁₂H₆NaO₃; masse moléculaire relative de 235,17), par exemple 5 mg/ml, dans du diméthylsulfoxyde (DMSO). Conserver cette solution à l'abri de la lumière à température ambiante durant un an au maximum.

5.10 Solution préparée de 7-éthoxyrésorufine (46 µmol/l).

Mesurer la concentration exacte de la solution mère (5.9) avec un spectrophotomètre à 482 nm en utilisant l'Équation (1). À 482 nm, le coefficient d'extinction molaire est de $2,25 \times 10^4$ (mol/l)⁻¹·cm⁻¹.

Diluer la solution mère (5.9) avec du DMSO afin d'obtenir une solution préparée de 46 µmol/l pour la méthode avec microplaque. Préparer cette solution au moment du dosage.

NOTE Une solution préparée de 400 µmol/l est utilisée pour la méthode employant une cuve (tube à essai).

5.11 β-naphthoflavone dissoute dans l'huile d'arachide.

Pour l'injection d'une dose de 50 mg de β-naphthoflavone (C₁₉H₁₂O₂; masse moléculaire relative de 272,3) par kilogramme de poisson (injection de 10 µl de solution dans l'huile par gramme de poisson), préparer une solution de 5 mg de β-naphthoflavone par millilitre d'huile d'arachide. Cette solution est agitée et amenée à une température de 45 °C ± 5 °C en utilisant un bain d'eau afin d'améliorer l'homogénéité.

NOTE Une dose même 10 fois inférieure à 50 mg/kg de poisson peut s'avérer suffisante pour l'induction de l'EROD. Par conséquent, il n'est pas très important d'utiliser la dose exacte.

6 Appareillage

L'équipement normal de laboratoire et de dissection et plus particulièrement l'équipement suivant.

6.1 Tubes cryogéniques.

6.2 Bombonne d'azote liquide ou congélateur, réglé à une température inférieure à -70 °C.

6.3 Spectrofluorimètre à cuve ou microplaque, pour des microplaques à 96 puits.

NOTE L'utilisation de microplaques blanches opaques permet de réduire significativement le bruit de fond fluorimétrique.

6.4 Centrifugeuse.

6.5 Broyeur, à tissu du type Potter Evehjem ou appareil équivalent.

6.6 pH-mètre.

6.7 Spectrophotomètre.

7 Échantillonnage et préparation des échantillons

7.1 Échantillonnage des poissons

Il convient que l'échantillonnage soit réalisé dans l'environnement naturel par pêche ou en laboratoire sur des poissons exposés à des substances ou des effluents tels que spécifiés dans l'ISO 23893-1.

Prélever au moins 10 poissons de la même espèce et du même sexe, ayant une taille uniforme, pour chaque groupe à examiner par rapport à l'activité EROD.

Ne pas prélever d'échantillons durant la saison de frai car l'habitat des poissons et leurs activités physiologiques peuvent être modifiés par leur activité sexuelle.

En prenant en compte les facteurs susceptibles d'influencer l'activité EROD, les conditions suivantes doivent être déterminées et indiquées dans le rapport d'essai:

[ISO/TS 23893-2:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/730eff44-462e-45a2-b0ba-0c7f8fcef886/iso-ts-23893-2-2007)

- a) la température de l'eau; <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/730eff44-462e-45a2-b0ba-0c7f8fcef886/iso-ts-23893-2-2007>
- b) une description générale de l'état de santé de chaque poisson (sexe, longueur, poids du corps, poids du foie, poids des gonades, présence de blessures externes et internes). Ceci est généralement indiqué en rapport avec l'échantillonnage tel que décrit dans l'ISO 23893-1.

Selon les objectifs de l'étude, il est important de s'assurer que les poissons témoins (provenant du site de référence ou du lot témoin au laboratoire) soient prélevés dans un environnement présentant une qualité écologique satisfaisante. Manipuler les poissons témoins et leurs échantillons de manière identique à ceux provenant des groupes examinés ou traités expérimentalement, à l'exception de l'exposition à une/des substance(s) concernée(s).

7.2 Mise à mort des poissons et dissection

Après la pêche ou suite à l'exposition, les poissons sont tués un à un et leur foie est disséqué au fur et à mesure que les poissons sont retirés de l'eau, tel que décrit dans l'ISO 23893-1. Prélever un morceau de foie (inférieur à 1 g), au même endroit du foie sur chaque poisson, aussi rapidement que possible après leur mort. Veiller à ne pas contaminer le foie avec la bile durant la dissection.

7.3 Conservation

Si le dosage ne peut pas être réalisé le même jour que l'échantillonnage, les échantillons de foie doivent être congelés immédiatement à une température inférieure à -70°C , en utilisant, par exemple, de l'azote liquide ou de la neige carbonique (dioxyde de carbone solide congelé). Les échantillons peuvent être conservés par la suite durant trois mois dans de l'azote liquide ou à une température inférieure à -70°C (6.2).

Si les mesurages de l'EROD sont réalisés le même jour que l'échantillonnage, l'étape préparatoire (8.1) doit commencer dans l'heure qui suit et les échantillons de foie doivent être maintenus ou conservés à une température inférieure à 4 °C.

8 Mode opératoire

8.1 Préparation des fractions

Avant de procéder au dosage, laver l'échantillon de foie dans une solution de KCl (5.2) et ensuite l'homogénéiser dans 4 ml de solution tampon phosphate (5.3) par broyage dans un homogénéisateur (6.5). Si des échantillons de foie plus petits (ou plus gros) sont utilisés, il convient que le volume soit réduit (ou augmenté) pour que le rapport tissu-tampon de 1 g/4 ml demeure constant. Réaliser cette opération à une température d'environ 4 °C en maintenant la solution tampon phosphate à 4 °C. La durée de broyage doit être comprise entre 0,5 min et 2 min, et les conditions et la durée de broyage doivent être identiques pour chaque échantillon. Un broyage en 5 à 10 «impulsions» est approprié pour la plupart des échantillons de foie.

Centrifuger les broyats à 10 000g (environ 90 000 m·s⁻²), à une température de 4 °C ± 3 °C durant 10 min à 20 min. Récupérer le surnageant (fraction S9) et le conserver à une température de 4 °C ± 3 °C. Le dosage de l'enzyme doit être réalisé dans l'heure qui suit.

NOTE Il est possible de congeler les broyats de foie rapidement dans des tubes cryogéniques (6.1) à une température inférieure à -70 °C en utilisant, par exemple, de l'azote liquide dans les conditions décrites en 7.3 à condition que les échantillons de foie (7.3) n'aient pas été congelés auparavant. Dans ce cas, les échantillons de foie doivent être préalablement homogénéisés tel qu'indiqué ci-dessus, mais en utilisant une solution tampon phosphate glycérol (5.4).

8.2 Dosage des protéines (standards.iteh.ai)

Pour chaque fraction S9, réaliser un dosage de protéines selon la Référence [22] ou selon la Référence [2]. Les kits d'essai commerciaux basés sur le principe de ces deux méthodes sont en vente dans le commerce. La concentration de l'étalon protéique [sérum d'albumine bovine (BSA)] doit être vérifiée en utilisant un spectrophotomètre si des étalons internes sont employés.

8.3 Dosage de l'activité EROD

8.3.1 Étalonage

8.3.1.1 Généralités

Réaliser un étalonage en utilisant une solution de résorufine (5.6) ou de rhodamine B (5.7) comme base. La fluorescence de la rhodamine B est 1,2 fois supérieure à celle de la résorufine à des concentrations molaires équivalentes.

8.3.1.2 Étalonage avec la résorufine

La linéarité de la courbe d'étalonage doit être déterminée et il convient de mesurer les échantillons au niveau de la partie linéaire de la courbe. Les échantillons extrêmement actifs doivent être dilués dans ce but. La partie linéaire de la courbe dépend de l'appareillage employé et de ses réglages.

Établir la plage de la résorufine en diluant la solution préparée (5.6) dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) avec les facteurs de dilution suivants: 1; 5; 10; 50; 100.

Préparer le mélange réactionnel selon 8.3.2.1 en remplaçant la 7-éthoxyrésorufine par la résorufine et la fraction S9 par une solution de protéines [sérum d'albumine bovine (BSA) ou extrait de protéines des espèces de poissons soumis à étude]. Il est recommandé d'utiliser une concentration de protéines aussi similaire que possible dans la pratique à celle des fractions S9 en cours d'analyse.