

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET
DE LA RECHERCHE

THESE DE DOCTORAT

Présentée à

L'ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

par
Gilles BOCQUENÉ

pour l'obtention du grade de DOCTEUR de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes

**L'ACETYLCHOLINESTERASE,
MARQUEUR DE NEUROTOXICITE.
APPLICATION A LA SURVEILLANCE DES EFFETS
BIOLOGIQUES DES POLLUANTS CHEZ LES ORGANISMES
MARINS.**

soutenue le 12 Février 1996
devant le jury composé de:

M. H. CECCALDI
M. Y. BENYAMIN
M. J.B. BERGÉ
M. D. FOURNIER
M. J.P. TOUTANT
M. F. GALGANI

Président du Jury.
Directeur de Thèse.
Rapporteur.
Rapporteur.
Rapporteur.
Examineur.

Thèse présentée dans le laboratoire
Organisation et Evolution Moléculaires de la Motilité Cellulaire.
Dr Yves BENYAMIN Directeur.

Remerciements

Je veux remercier tout particulièrement les personnes suivantes:

Mr Hubert J. CECCALDI pour accepter la présidence du jury de cette thèse.

Mrs Didier FOURNIER, Jean-Pierre TOUTANT et Jean B. BERGÉ pour avoir accepté d'en être les rapporteurs.

Mrs. Yves BENYAMIN et François GALGANI pour m'avoir encouragé à rédiger ce document en me mettant le pied à l'étrier.

Je remercie également tous ceux qui m'ont aidé à travers leur spécialité : Pierre MICHEL, Benoit BELIAEFF, Dominique SOUDANT, Raymond KAAS, Marie-Jo THEBAUD, Mme ROCHERON, Louis GIBOIRE, Philippe TRUQUET et Thierry BURGEOT. Pardon à ceux que j'oublie !

Les structures de l'IFREMER m'ont permis ce parcours et celles de l'INRA m'ont accueilli.

Merci aussi à tous les amis, copains, collègues qui m'entourent.

Enfin je salue tous ceux qui animent l'Ecole Pratique des Hautes Etudes sans lesquels ce document n'aurait pu être validé et je tiens à exprimer l'attachement que j'aurai désormais à cette Ecole.

A Francine,
à Julien, Anaïs et Marine

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE : POLLUTION ET BIOMARQUEURS	15
CHAPITRE 1 : LES CHOLINESTERASES	19
1. Les cholinestérases : marqueurs de contamination	19
1-1. Les cholinestérases des vertébrés et des invertébrés	20
1-1-1. Les cholinestérases des vertébrés	20
1-1-2. Les cholinestérases d'invertébrés	21
1-2. L'acétylcholinestérase	21
1-2-1. Structure de l'acétylcholinestérase chez les vertébrés	22
1-2-1-2. Structure de l'AChE chez les invertébrés	25
1-2-2. Le site actif	26
1-2-3. Hydrolyse de l'acétylcholine (ACh).....	29
1-3. Caractérisation de l'activité cholinestérasique chez plusieurs espèces marines	29
1-3-1. Matériels et méthodes	30
1-3-1-1. Le lecteur de microplaques	30
1-3-1-2. Mesure de l'activité AChE	30
1-3-1-3. Dosage des protéines totales	31
1-3-2. Résultats	32
1-3-2-1. Activités cholinestérasiques chez huit espèces marines	32
1-3-2-2. Conservation des extraits	33
1-3-2-3. Détermination d'une température optimale de mesure	34
1-3-2-4. Variations naturelles de l'activité AChE chez quelques espèces marines	35

<p>Publication 1 : Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. <i>Marine Environmental Research</i> 30 (1990) 75-89.</p>
--

1-4. Polymorphisme des cholinestérases chez les invertébrés : les différentes formes d'acétylcholinestérase chez l'huître	56
1-4-1. Matériels et méthodes	57
1-4-1-1. Animaux	57
1-4-1-2. Extraction des cholinestérases chez l'huître	57
1-4-1-3. Procédure de purification des cholinestérases de branchie	58
1-4-1-4. Séparation des différentes cholinestérases	58
1-4-1-5. Migration en électrophorèse non-dénaturante des formes séparées	59
1-4-1-6. Traitement PI-PLC de la forme amphiphile	60
1-4-1-7. Spécificités des formes AChE vis à vis de différents substrats et inhibiteurs	60
1-4-1-8. Distribution des différentes formes de l'AChE dans les organes de l'huître	60
1-4-2. Résultats	60
1-4-2-1. Extraction , purification et séparation	60
1-4-2-2. Migration des formes séparées en électrophorèse non dénaturantes	62
1-4-2-3. Digestion de la forme hydrophobe par la PI-PLC	63
1-4-2-4. Spécificité des deux formes vis à vis de différents substrats et inhibiteurs	64
1-4-2-5. Distribution des deux formes d'AChE dans les principaux organes de l'huître	67
1-4-3. Discussion et comparaison avec les cholinestérases d'autres invertébrés	69

Publication 2 : The molecular forms of acetylcholinesterase from the common oyster (*Crassostrea gigas*).

Soumis pour publication

CHAPITRE 2: LES INHIBITEURS DE CHOLINESTERASES	89
Introduction : les molécules contaminantes douées de pouvoir inhibiteur	89
2-1. Les produits phytosanitaires	90
2-1-1. Organophosphates et carbamates	91
2-1-1-1. Les organophosphorés	93
2-1-1-1-1. Structure chimique des OPs	94

2-1-1-1-2. Apports, transferts et teneurs en OPs dans l'environnement	95
2-1-1-1-3. Mécanisme d'inhibition des cholinestérases par les OPs	98
2-1-1-2. Les carbamates	99
2-1-1-2-1. Structure chimique des carbamates	99
2-1-1-2-2. Apports, transfert et niveaux des carbamates dans l'environnement	100
2-1-1-2-3. Mécanisme d'inhibition des cholinestérases par les Cs	100
2.1.2. Pyrèthrinoïdes, triazines et paraquat	101
2-2. Les anatoxines algales	102
2-3. Métaux et métalloïdes	103
2-4. Action combinée de mélanges de contaminants sur l'activité AChE de plusieurs espèces marines	106
2-4-1. Matériels et méthodes	107
2-4-1-1. Extraits enzymatiques	107
2-4-1-2. Contaminants testés	108
2-4-1-3. Méthode de détermination de la CI_{50}	108
2-4-1-4. Méthode de détermination des effets d'un mélange	109
2-4-2. Résultats et discussion	114
2-4-2-1. Détermination de la CI_{50} de plusieurs organophosphores et carbamates	114
2-4-2-1-1. Influence de la durée de l'incubation sur la détermination de la CI_{50}	114
2-4-2-2. Etude des effets inhibiteurs de quelques contaminants majeurs du milieu marin.....	116
2-4-2-3. Toxicité conjuguée des mélanges d'organophosphorés et de carbamates	117
2-4-2-3-1. Influence de la durée d'incubation sur les effets inhibiteurs de mélanges d'OPs et Cs	117
2-4-2-3-2. Effets inhibiteurs des mélanges d'organophosphorés et de carbamates	118
2-4-2-4. Toxicité conjuguée de mélanges inhibiteur/contaminant	120

Publication 3 : Joint action of combinations of pollutants on the acetylcholinesterase activity of several marine species.

Ecotoxicology 4, 266-279 (1995).

CHAPITRE 3. QUELQUES APPLICATIONS DES MESURES DES CHOLINESTERASES DANS LE MILIEU MARIN

3 - Quelques applications des mesures des cholinestérases dans le milieu marin	140
3-1. Mesure des activités AChE chez la limande sur une radiale contaminée de la Mer du Nord	141
3-1-1. Localisation du gradient de pollution	141
3-1-2. Etudes des activités cholinestérasiques de Limande (<i>Limanda limanda</i>) du German Bight Transect	142
3-1-3. Discussion	146
3-2. Mesure des activités AChE chez le callionyme en Baie de Vilaine	152
3-2-1. La baie de Vilaine	152
3-2-2. Choix du callionyme et niveaux d'activité des cholinestérases chez cette espèce en Baie de Vilaine	152
3-3. Mesure des activités AChE chez le poisson chirurgien <i>Acanthurus bahianus</i> en Martinique	157
3-3-1. Utilisation des insecticides sur l'île de la Martinique	157
3-3-2. Niveaux d'activité AChE chez <i>Acanthurus bahianus</i>	158
3-4. Etude de l'écotoxicité de boues de dragage et suivi des dépôts	161
3-4-1. Matériels et méthodes	161
3-4-2. Résultats et discussion	162
3-5. Mesure des activités AChE chez plusieurs espèces méditerranéennes	169
3-5-1. Matériels et méthodes	169
3-5-2. Résultats et discussion	170

Publication 4 : Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea.

Marine Ecology Progress Series. Sous Presse.

3-6. Mesure des activités AChE chez la palourde et l'huître soumises	
à un traitement au dichlorvos	195
3-6-1. Matériels et méthodes	195
3-6-2. Résultats et discussion	196

Publication 5 : Laboratory study on the effect of dichlorvos on two commercial bivalves.

Aquaculture. Sous Presse.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES	217
---	-----

BIBLIOGRAPHIE	222
----------------------------	-----

Publication 6 : Cholinesterase inhibition by organophosphorous and carbamate compounds

Sous presse pour Techniques In Marine Environmental Sciences

LISTE DES PUBLICATIONS	248
-------------------------------------	-----

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Position de la sérine active dans la séquence en acides aminés du site actif chez quelques espèces (d'après Hucho <i>et al.</i> ,1991)	27
Tableau 2 : Distribution des activités d'hydrolyse de l'AcSCH, de la BuSCh et de la PrSCh dans différents organes de huit espèces marines	33
Tableau 3 : Effets de la congélation et de la lyophilisation sur la stabilité de l'activité d'hydrolyse de l'AcSCH d'extraits bruts de différents organismes marins	34
Tableau 4 : Hydrolyse de l'AcSCH dans les principaux tissus de l'huître commune	61
Tableau 5 : Effet de la digestion à la PI-PLC sur la partition en phase Triton XII4 de la forme AChE membranaire chez l'huître	63
Tableau 6 : Caractéristiques cinétiques des deux formes d'acétylcholinestérase chez l'huître vis-à-vis de trois substrats	65
Tableau 7 : Constantes d'inhibition de six inhibiteurs sur les deux formes de l'AChE d'huître	67
Tableau 8 : Distribution des deux formes de l'AChE dans les différents tissus de l'huître	68
Tableau 9: Comparaison entre les constantes d'inhibition des deux formes d'AChE d'huître et les AChEs de diverses origines vis-à-vis de quatre inhibiteurs	72
Tableau 10 : CI ₅₀ des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase du vairon (<i>Pimephales promelas</i>) d'après Olson et Christensen (1980)	90
Tableau 11 : Liste des 39 pesticides de la directive 76/464/EEC concernant la pollution par des substances dangereuses déchargées dans l'environnement aquatique (Barcelo, 1993)	92
Tableau 12 : Liste nationale des 30 substances actives prioritaires établie par le Comité de liaison eau-produits phytosanitaires des Ministères de l'Agriculture, de l'Environnement et de la Santé (20 mai 1994)	92

Tableau 13: Temps de demi-vie de quelques OPs en eau douce à 4° C et 21° C (Franck et al.,1991) et en eau saumâtre à 20 ‰ NaCl à température ambiante (Lacorte <i>et al.</i> ,1995)	96
Tableau 14 : Effets de quelques métaux sur l'hydrolyse de l'AcSCh chez quatre espèces marines	103
Tableau 15 : Effets des formes organiques de l'arsenic sur l'hydrolyse de l'AcSCh par le muscle adducteur de moule	105
Tableau 16 : Détermination de la CI ₅₀ de cinq insecticides sur l'hydrolyse de l'AcSCh chez quatre espèces marines	115
Tableau 17 : Effets de la durée d'incubation sur la toxicité conjuguée de différentes associations d'insecticides sur l'hydrolyse de l'AcSCh chez trois espèces marines	118
Tableau 18 : Effets combinés de mélanges d'organophosphoré et de carbamate sur l'hydrolyse de l'AcSCh chez quatre espèces marines	119
Tableau 19 : Effets du chlorure de zinc (10mg/l) et du chlorure de cadmium (0.1 mg/l) sur le pouvoir inhibiteur de 5 insecticides vis-à-vis de l'hydrolyse de l'AcSCh chez le callionyme	121
Tableau 20 : Effets combinés de mélanges d'arsenite et d'organophosphorés et carbamates sur l'hydrolyse de l'AcSCh chez quatre espèces marines	122
Tableau 21: Hydrolyse de l'AcSCH et de la BuSCh dans 4 organes de la limande	143
Tableau 22 : Niveaux d'activités de détoxification EROD dans le foie de limandes capturées dans le German Bight	148

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation des structures quaternaires des formes globulaires (G) et asymétriques (A) d'AChE (d'après Massoulié et Bon, 1982)	22
Figure 2 : Représentation des 2 types de sous-unités catalytiques et des formes moléculaires de l'acétylcholinestérase (d'après Massoulié <i>et al.</i> , 1992)	23
Figure 3 : Représentation spatiale de l'acétylcholinestérase (d'après Sussman, 1991)	24
Figure 4 : Structure tri-dimensionnelle du dimère G2 de l'acétylcholinestérase de torpille (d'après Massoulié <i>et al.</i> , 1993)	25
Figure 5 : Représentations de la gorge du site actif de l'acétylcholinestérase	28
Figure 6 : Hydrolyse de l'AcSCh en fonction de la taille chez <i>M. barbatus</i> sur trois stations différentes	36
Figure 7 : Hydrolyse de l'AcSCh en fonction de la taille dans le muscle dorsal chez <i>Callionymus lyra</i>	37
Figure 8 : Hydrolyse de l'AcSCh en fonction de la taille dans le cerveau chez <i>Callionymus lyra</i>	37
Figure 9 : Migration électrophorétique des cholinestérases de l'huître	62
Figure 10 : Conversion de la fraction AChE membranaire en AChE soluble par traitement à la PI-PLC	64
Figure 11 : Hydrolyse des substrats AcSCh, PrSCh et BuSCh par les deux formes de cholinestérase de la branchie d'huître	65
Figure 12: Cinétique partielle de $v = f([s])$ de la forme membranaire de l'acétylcholinestérase de branchie d'huître vis-à-vis de l'acétylthiocholine	66

Figure 13: Cinétique partielle de $v = f([s])$ de la forme soluble de l'acétylcholinestérase de branchie d'huître vis-à-vis de l'acétylthiocholine	66
Figure 14 : Exemple de détermination d'une CI50 à partir de la lecture d'une plaque à microtitration grâce au logiciel de calcul itératif	110
Figure 15 : Exemple de détermination des effets combinés de deux inhibiteurs à partir de la lecture d'une microplaque et grâce au logiciel de calcul itératif	111
Figure.16. Représentation graphique selon Gaddum de la nature des effets combinés de deux toxiques	113
Figure 17 : Détermination de la CI50 de la phosalone sur l'AChE de callionyme en fonction de la durée de l'incubation inhibiteur/AChE	114
Figure 18 : Détermination de la nature des effets d'un mélange d'inhibiteurs en fonction de la durée de l'incubation	117
Figure 19 : Localisation des stations d'étude du German Bight en Mer du Nord	142
Figure 20 : Hydrolyse de l'AcSCh par les cholinestérases musculaires de limandes capturées sur 7 stations du German Bight Transect	144
Figure 21 : Hydrolyse de la BuSCh par les cholinestérases musculaires de limandes capturées sur 7 stations du German Bight Transect	144
Figure 22 : Valeurs de Km pour l'acétylthiocholine des extraits enzymatiques de muscles de limandes sur 6 stations du German Bight Transect	145
Figure 23 : Niveaux de concentrations en méthyl-parathion dans le German Bight en janvier 1987 (d'après l'Institut Hydrographique Allemand)	147
Figure 24 : Concentrations en cadmium dans le sédiment et dans le foie de limandes du German Bight Transect	150
Figure 25 : Concentrations en mercure dans le sédiment et dans le foie de limandes du German Bight Transect	151

Figure 26 : Hydrolyse de l'AcSCh dans le cerveau de callionymes capturés dans la baie de Vilaine	153
Figure 27 : Hydrolyse de l'AcSCh dans le muscle dorsal de callionymes capturés dans la baie de Vilaine	154
Figure 28 : Hydrolyse de l'AcSCh dans le muscle de truites capturées dans trois rivières canadiennes (d'après Payne <i>et al.</i> , 1994)	155
Figure 29 : Hydrolyse de l'AcSCh dans le muscle dorsal de <i>Acanthurus bahianus</i> sur 9 stations du littoral martiniquais	159
Figure 30 : Hydrolyse de l'AcSCh chez des callionymes capturés sur et à proximité de zones de dépôts de boues de dragage portuaire en baie de Seine et en estuaire de Loire	163
Figure 31 : Niveaux d'activités de détoxification EROD chez la sole prélevée en estuaire de Loire à proximité d'une zone de relargage de boues de dragage portuaire	164
Figure 32 : Hydrolyse de l'AcSCh chez des soles capturées sur et à proximité de zones de dépôts de boues de dragage portuaire en estuaire de Loire et estuaire de Gironde	165
Figure 33 : Effets inhibiteurs <i>in vitro</i> sur l'activité AChE de <i>C. lyra</i> et <i>S. solea</i> de différentes dilutions d'extraits aqueux de boues de dragage prélevées dans les ports de Le Havre, St Nazaire et Calais	166
Figure 34 : Tests de spermioxicité des sédiments portuaires	168
Figure 35 : Effets de la durée de sédimentation sur les effets inhibiteurs <i>in vitro</i> d'extraits aqueux de sédiments de différents sites contaminés de Méditerranée Nord-Occidentale	171
Figure 36 : Effets de la durée de sédimentation sur les effets inhibiteurs <i>in vitro</i> d'extraits aqueux de sédiments de différents sites de référence de Méditerranée Nord-Occidentale	171

Figure 37 : Classement des sédiments prélevés dans différents sites prospectés lors de la campagne Métromed en fonction de leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis d'un extrait AChE de rouget	172
Figure 38 : Hydrolyse de l'AcSCH chez <i>M. barbatus</i> capturés en Méditerranée Nord-Occidentale	175
Figure 39 : Hydrolyse de l'AcSCH chez <i>M. surmuletus</i> capturés en Méditerranée Nord-Occidentale	175
Figure 40 : Hydrolyse de l'AcSCH chez <i>S. cabrilla</i> capturés en Méditerranée Nord-Occidentale	176
Figure 41 : Hydrolyse de l'AcSCH chez <i>S. hepatus</i> capturés en Méditerranée Nord-Occidentale	176
Figure 42 : Effets de traitements à 0.1 mg/l et 1 mg/l de dichlorvos pendant 6 heures sur l'activité AChE de branchies d'huître	197
Figure 43 : Effets de traitements à 0.1 mg/l et 1 mg/l de dichlorvos pendant 6 heures sur l'activité AChE de palourde	198

LISTE DES ABREVIATIONS

ACh : acétylcholine
AChE : acétylcholinestérase
AcSCh : acétylthiocholine
BuChE : butyrylcholinestérase
BuSCh : butyrylthiocholine
BCF : Bio Concentration Factor (facteur de bioaccumulation)
C : carbamates
CIEM : Conseil International pour l'Exploration de la Mer
DTNB : Dithiobisnitrobenzoate
DNP : Diethylnitrophenylphosphate = paraoxon
E.T. : erreur-type
EROD : Ethoxyrésorufine-O-dééthylase
GPI : glycosyl-phosphatidylinositol
 K_m : constante de Michaëlis
MFO : Mixed Function Oxydases
MXR : Multi Xenobiotic Resistance
NTE : Neuropathy Target Esterase
OP : organophosphorés
PAH : Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Hydrocarbures
PCB : Polychorobiphényles
PI-PLC : phosphatidylinositol-phospholipase C
PNUE : Programme des Nations Unies pour l'Environnement
PrSCh : propionylthiocholine
RNO : Réseau National d'Observation
UIPP : Union des Industries pour la Protection des Plantes
WHO : World Health Organization (Organisation Mondiale de la Santé)

INTRODUCTION GENERALE :
POLLUTION ET BIOMARQUEURS

INTRODUCTION GENERALE : POLLUTION ET BIOMARQUEURS

Les océans : réservoir de $1.37 \cdot 10^{21}$ litres et réceptacle ultime de la plus grande partie des polluants d'origine anthropique. Quantifier les apports de ces contaminants au milieu marin est difficile et certains chiffres peuvent sembler alarmants quand on estime à plus d'un million de tonnes la présence de DDT dans les océans du globe (Laubier, 1991) ou quand on réalise que certaines molécules telles que le tributylétain (TBT, larvicide inclu dans les peintures de navire) ou le dichlorvos (DDVP, organophosphoré utilisé en aquaculture contre les copépodes parasites du saumon) présentent des effets toxiques à des concentrations de quelques nanogrammes par litre.

Dans les années 50, on admettait volontiers, malgré l'absence de mesures réglementaires sur les rejets, que le pouvoir autoépurateur et la capacité d'assimilation des océans suffisaient à contenir les problèmes de pollution à quelques zones littorales. Des événements comme la contamination par le mercure de la baie de Minamata au Japon (qui fit une centaine de morts) ou les échouages successifs de pétroliers sur la côte bretonne firent prendre conscience de la limite des équilibres écologiques et de la nécessité de dispositions réglementaires. La préservation du milieu est donc devenue, en deux décennies, un des soucis majeurs du public et l'une des priorités des autorités et des professionnels de la mer dans les pays industrialisés. Cette sensibilisation, largement soutenue par les médias et quelques fortes personnalités du monde marin, n'est pas étrangère aux décisions importantes qui ont été prises en matière de préservation et surveillance de la qualité du milieu marin. L'étude des pollutions et de leurs effets sur les écosystèmes qui découle de cette prise de conscience est une discipline récente dont le développement est consécutif à l'augmentation des rejets et accidents liés à l'intensification des activités humaines dans cette seconde partie du XX^{ème} siècle.

Les stratégies de surveillance de l'environnement sont plus que jamais au coeur des préoccupations de groupes d'études émanants d'instances européennes ou internationales à travers les nombreux programmes scientifiques initiés par le Conseil International pour l'Exploration de la Mer (CIEM-ICES, 1978), la Commission Océanographique Intergouvernementale (IOC-UNESCO, 1986), le Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE) et diverses commissions de la CEE. La France a joué, dans ce domaine, un rôle pilote en créant dès 1974 un Réseau National d'Observation de la Qualité du Milieu Marin

(R.N.O.) qui assure le suivi des niveaux de nombreux contaminants métalliques et organiques dans l'eau, la matière vivante et le sédiment.

Si les travaux des réseaux de surveillance tels que le RNO sont indispensables à l'établissement de tendances pour de nombreux contaminants (à l'augmentation, la stagnation ou la diminution), plusieurs familles de toxiques instables échappent à cette surveillance, soit parce que l'analyse chimique de ces molécules présente des difficultés techniques, soit parce que le devenir de tels polluants dans le milieu est mal connu (dans ce cas le problème est d'identifier le ou les produits de dégradation à analyser), soit enfin parce que les priorités en matière de surveillance évoluent. Enfin les mesures de teneurs en polluants ne renseignent pas sur les effets toxiques sur la faune marine, la ressource et les écosystèmes. On comprend mieux l'intérêt qu'il y a à développer des tests biologiques (ou biomarqueurs) des effets des polluants qui permettent de mettre en évidence les désordres cellulaires ou moléculaires précoces.

De nombreuses définitions du mot biomarqueur ont été proposées qui reprennent sensiblement les mêmes termes : il s'agit d'une modification significative d'un mécanisme biologique en réponse à la présence dans le biotope naturel de l'organisme cible (qualifié aussi de sentinelle ou bioindicateur) de molécules contaminantes. La modification peut être une perturbation, c'est le cas de l'inhibition des cholinestérases par les neurotoxiques, de la formation d'adduits à l'ADN ou de mutations sur les oncogènes. Elle peut être aussi une induction de systèmes de détoxification, systèmes MFO (Mixed Function Oxydase) ou métalloprotéines et dans ces deux cas le terme de perturbation n'est pas tout à fait adapté puisqu'il s'agit d'amplification de mécanismes naturels.

Ce concept de biosurveillance a été développé à la fin des années 80 et, l'enthousiasme aidant, certains scientifiques n'étaient pas loin de penser que les biomarqueurs se substitueraient, à terme, à l'analyse chimique dans l'établissement d'un diagnostic de la pollution. La complexité du métabolisme des xénobiotiques et de la mise en place des mécanismes de détoxification chez l'animal, la difficulté à interpréter les désordres constatés ont remis en question cette première approche des biomarqueurs. Dans les années à venir, l'accent sera mis sur l'interface chimie/biologie car l'interdépendance de ces deux disciplines est une composante majeure de la surveillance des effets des polluants. L'utilisation des biomarqueurs est donc complémentaire des données de la chimie et dans les années futures, les efforts devraient porter sur la relation entre ces deux types de données. Cette relation, quand elle est démontrée, est l'étape

avancée indispensable à l'interprétation correcte des altérations biologiques mesurées.

Dans la phase actuelle d'initiation à la surveillance biologique, les premières étapes consistent à caractériser dans un test biologique, le mécanisme et sa perturbation, c'est-à-dire avoir la connaissance la plus complète des systèmes moléculaires en jeu pour différencier les modifications dues à la contamination du milieu et celles liées à la variabilité naturelle. Dans un deuxième temps, il est conséquent de faire le constat sur le terrain d'éventuelles perturbations indépendantes des variations physiologiques naturelles connues qui vont permettre de valider le test. Plusieurs campagnes de surveillance du littoral marin ont mis en évidence de telles modifications.

La liste des biomarqueurs moléculaires potentiels développés depuis une dizaine d'années reste limitée. On peut citer chez les poissons les différents stades pouvant conduire à la formation de tumeurs conséquence de l'exposition aux PCBs, PAHs, et dioxines. L'induction des systèmes de détoxification MFO/EROD par ces molécules est déjà intégrée dans les réseaux de surveillance de la North Sea Task Force sous l'égide du CIEM. Les étapes suivantes de cette filière de la cancérogenèse telles que la formation d'adduits à l'ADN, l'activation des oncogènes, la formation de micronuclei et d'aberrations chromosomiques, regroupés sous le terme de génotoxicité, restent encore du domaine de la recherche méthodologique.

L'induction des métalloprotéines ou métallothionéines par les métaux lourds tels que le cadmium, le zinc ou le mercure est toujours développée par plusieurs équipes. D'autres marqueurs tels que les protéines MXR (Multi Xenobiotic Resistance) impliquées dans le transport membranaire font actuellement l'objet de programmes de recherche exploratoire.

Enfin l'inhibition des cholinestérases peut être considérée comme un des premiers biomarqueurs proposé en surveillance puisque son développement en médecine humaine en tant qu'indice d'exposition aux neurotoxiques, notamment aux organophosphates des gaz de combat, remonte à plusieurs décennies.

Ce travail est entièrement consacré aux cholinestérases, au polymorphisme important de ces enzymes tant sur le plan moléculaire que sur le plan cinétique, à leurs inhibiteurs, à la mise en évidence d'effets neurotoxiques liés à la pollution du milieu marin et à la signification de ces modifications. Enfin les perspectives d'accroître la sensibilité de ce biomarqueur sont discutées.

CHAPITRE 1 :
LES CHOLINESTERASES

CHAPITRE 1. LES CHOLINESTERASES

1. Les cholinestérases : marqueurs de contamination

Pendant plusieurs dizaines d'années l'inhibition des cholinestérases a été le seul outil de diagnostic, chez l'homme, des intoxications accidentelles ou volontaires par les insecticides organophosphorés (OP) et les carbamates (C). En effet, les accidents liés à la manipulation, aux stades de fabrication ou d'utilisation de ces substances, et les cas de suicide par ingestion sont assez fréquents.

Puis le développement récent des biomarqueurs axés sur l'étude des réponses biologiques des organismes exposés aux contaminants a fourni les outils biochimiques essentiels à la mise en place de projets de surveillance des effets biologiques de la pollution. Le développement et la validation *in situ* de telles techniques sont l'objet de contraintes particulières telles que la spécificité de la relation entre le polluant et la réponse biologique, la connaissance des variabilités naturelles de la réponse et le choix de l'espèce cible (ou bioindicateur).

Parmi ces outils nouveaux appliqués à l'environnement on retrouve l'utilisation des cholinestérases, et notamment de l'acétylcholinestérase, et son inhibition en tant qu'indicateur d'exposition aux effets neurotoxiques de certains polluants.

L'inhibition peut être exploitée de deux manières:

- - en tant que biomarqueurs des effets d'une exposition à des inhibiteurs *in situ*. Cet usage des cholinestérases nécessite de disposer d'espèces dites sentinelles ou bioindicatrices capturées dans le milieu et répondant à un certain nombre de contraintes liées à la surveillance. Dans ce contexte il s'agit d'analyser les niveaux d'activité AChE de ces animaux sur différentes zones et de les comparer.
- - en tant qu'indice de qualité des eaux ou des sédiments. Dans ce cas les incubations d'échantillons d'eau ou d'extraits de sédiment avec des cholinestérases, *in vitro*, permettent de mettre en évidence des traces d'inhibiteurs dans les différents compartiments du milieu marin à des niveaux de l'ordre du ppb ($\mu\text{g/l}$). Les enzymes sont généralement immobilisées sur une membrane et couplée à un transducteur (pH mètre) sous la forme de biocapteurs déjà largement utilisés dans la détection des insecticides organophosphorés et carbamates.

Si les cholinestérases sont l'objet d'importantes recherches, à la fois sur le plan fondamental et sur le plan médical, ces enzymes ont été peu étudiées chez les organismes marins si on excepte le poisson torpille (*Torpedo marmorata*). Sur le plan fondamental, la compréhension des mécanismes de formation du complexe enzyme-substrat ou enzyme-inhibiteur, l'implication de chacun des acides aminés formant le site actif dans cette relation, la structure tridimensionnelle de la gorge active et le polymorphisme important de ces enzymes sont sujets de programmes de recherche importants notamment en France, aux USA et en Israël. L'expression du polymorphisme de l'enzyme et de son ancrage éventuel à partir de la connaissance du gène sont l'objet de travaux importants. Sur le plan médical, le rôle primordial de ces enzymes dans la transmission de l'influx nerveux, leur implication dans la maladie d'Alzheimer et le fait qu'elles soient la cible de nombreux composés neurotoxiques industriels, domestiques ou militaires sont le thème de recherche de nombreux laboratoires civils et des armées.

1-1. Les cholinestérases des vertébrés et des invertébrés.

Les cholinestérases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des esters de la choline plus rapidement que les autres esters. Les tentatives de classification de ces enzymes n'ont jamais réellement abouti à une nomenclature définitive des différentes cholinestérases tant les comportements cinétiques et le polymorphisme inter et intraspécifique de ces enzymes sont proches.

On différencie d'abord les cholinestérases des autres estérases (ali- et arylestérases) par leur sensibilité au carbamate éserine à 10^{-5} M.

1-1-1. Les cholinestérases des vertébrés

On a longtemps distingué l'acétylcholinestérase (AChE, EC 3.1.1.7.) de la butyrylcholinestérase (BuChE, EC 3.1.1.8.) sur des critères essentiellement cinétiques (Massoulié et Toutant, 1988) dont la vitesse d'hydrolyse vis-à-vis de différents esters de choline (acétyl, butyryl et propionylcholine), l'inhibition spécifique de l'AChE par le BW 284C51 (bis (4-allyldiméthylammonium phényle)pentan-3-one bromide) et l'inhibition de la BuChE par l'iso-OMPA (tétramonoisopropylpyrophosphor-tétramide). Enfin on admet que l'AChE présente une inhibition par excès de substrat mais pas la BuChE.

L'isolement récent des gènes des cholinestérases chez les vertébrés a confirmé la très forte homologie, chez une même espèce, dans la séquence nucléotidique des sites actifs des deux cholinestérases mais qu'il existe bien deux types distincts de cholinestérases codés par deux gènes différents.

Ces deux types de cholinestérases diffèrent non seulement par leurs propriétés catalytiques, moléculaires et génétiques mais aussi par leur rôle biologique. L'acétylcholine est le substrat privilégié de l'acétylcholinestérase et le rôle physiologique de cette enzyme est parfaitement connu et décrit (bien que des fonctions non cholinergiques de l'AChE aient été récemment mises en évidence notamment au cours de l'embryogénèse). En revanche le rôle de la butyrylcholinestérase n'est pas encore bien élucidé, la butyrylcholine n'étant pas un substrat naturel des organismes vivants. Chez l'être humain, l'existence de la butyrylcholinestérase ne semble pas indispensable bien qu'on ait montré que certaines mutations de la BuChE bloquent l'hydrolyse de la succinylcholine utilisée comme anesthésique. Néanmoins selon Landry *et al.*, (1993) l'une des principales voies de détoxification de la cocaïne ferait intervenir la butyrylcholinestérase.

1-1-2. Les cholinestérases d'invertébrés.

Chez les invertébrés il n'y a pas de butyrylcholinestérase.

Chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*) un seul gène code pour une acétylcholinestérase capable d'hydrolyser les deux substrats AcSCh et BuSCh (Fournier *et al.*, 1988a, 1989). Chez le nématode *Caenorhabditis elegans* trois gènes distincts codent pour trois AChEs, le produit du gène *ace-1* présentant 42 % d'homologie avec l'AChE de poisson-torpille (*Torpedo marmorata*) et 41 % d'homologie avec la BuChE humaine (Arpagaus *et al.*, 1994). Les propriétés du produit de *ace-1* en font sans conteste une acétylcholinestérase.

1-2. L'acétylcholinestérase

Dans les jonctions neuromusculaires et interneuronales, la terminaison nerveuse libère un médiateur chimique, l'acétylcholine, qui va permettre la transmission de l'influx nerveux. L'acétylcholinestérase, en inactivant rapidement l'acétylcholine, permet au système de revenir immédiatement à son état de repos. L'inhibition de l'acétylcholinestérase par de nombreux neurotoxiques dont les OP et C va provoquer l'accumulation de l'acétylcholine dans l'espace synaptique et l'acétylcholine accumulée maintient une transmission permanente de l'influx nerveux qui conduit à la tétanie musculaire et la mort.

Comme on l'a vu précédemment, l'AChE posséderait d'autres fonctions, non cholinergiques, encore mal connues (Toutant et Massoulié, 1988a). Selon Appleyard (1994), de nombreux arguments suggèrent que cette enzyme joue un rôle de médiateur chimique de l'activité neuronale : la présence

d'acétylcholinestérase catalytiquement inactive dans le reticulum endoplasmique de certaines cellules (du muscle et du cerveau de poulet par exemple), la forte concentration d'AChE dans des zones à faible activité cholinergique (certaines régions du cerveau) et l'existence de fortes proportions de formes solubles. D'autres évidences telles que l'ouverture des canaux K^+ et l'inactivation des canaux Na^+ directement par l'acétylcholinestérase conforteraient cette hypothèse. Greenfield (1991) met en évidence la modification de l'excitabilité de certains neurones par l'AChE bien que celle-ci soit inhibée par un organophosphate et donc que le site actif n'est pas impliqué dans ce rôle.

1-2-1. Structure de l'acétylcholinestérase chez les vertébrés

L'acétylcholinestérase présente un polymorphisme moléculaire important chez les vertébrés, polymorphisme qui résulte de différentes associations de la même sous-unité catalytique (fig. 1) mais aussi de la nature de l'ancrage de l'enzyme aux structures synaptiques (fig. 2). Il faut noter que la butyrylcholinestérase présente le même type d'associations.

La forme générale de la sous-unité catalytique est une ellipsoïde de 40 Å par 60 Å par 65 Å (fig. 3 et fig. 4). C'est une enzyme qui appartient à la classe des α/β protéines et consiste en un large fragment central composé de 12 brins β entourés de 15 hélices α . La chaîne polypeptidique qui forme l'unité catalytique de " base " est constituée de 537 acides aminés chez le poisson torpille *Torpedo californica* dont les organes électriques sont extrêmement riches en cholinestérases.

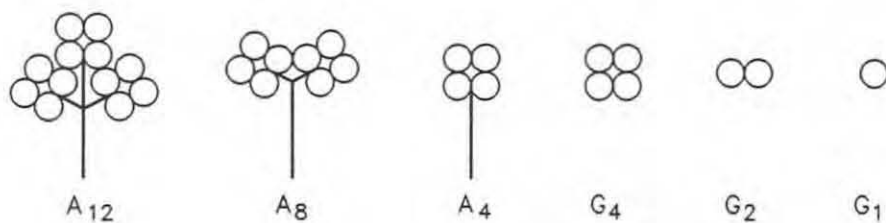


Figure 1 : Représentation des structures quaternaires des formes globulaires (G) et asymétriques (A) d'AChE (d'après Massoulié et Bon, 1982)

De manière générale on admet l'existence de deux séries de formes polymériques, la première est due à la formation post transcriptionnelle de dimères et tétramères à partir d'associations par des ponts disulfures du monomère catalytique ($\cong 70$ kDa) qui aboutit aux formes dites globulaires (G_1 , G_2 , G_4), la seconde est composée de un, deux ou trois tétramères de sous-unités associés à une queue de collagène et constitue les formes asymétriques (A_4 , A_8 , A_{12}). Il est intéressant de noter que les invertébrés sont dépourvus des formes asymétriques. Plus récemment, dans leurs recommandations pour une nomenclature des cholinestérases, Massoulié *et al.* (1992) proposent un schéma semblable à celui de la fig. 1 mais qui repose sur les produits des séquences codantes du gène et qui précise le type d'ancrage (fig. 2) de l'enzyme.

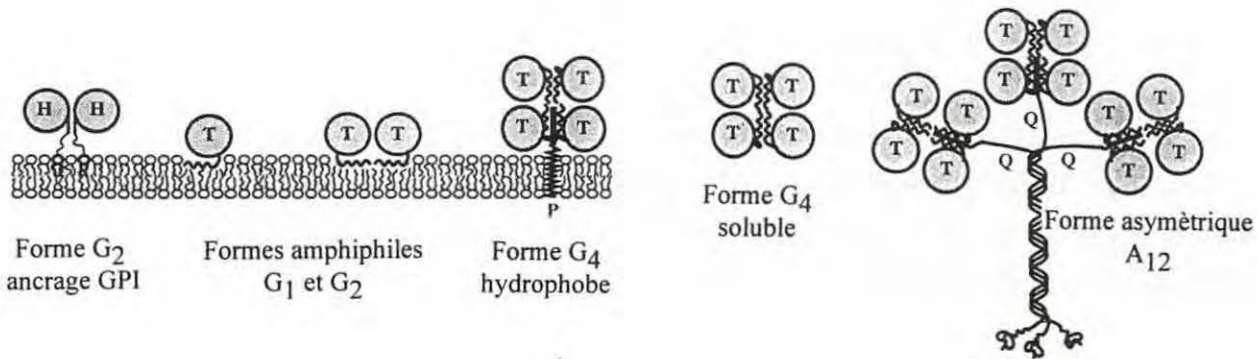


Figure 2: Représentation des 2 types de sous-unités catalytiques et des formes moléculaires de l'acétylcholinestérase (d'après Massoulié *et al.*, 1992)

Sous-unité T : sous-unité catalytique qui peut former des polymères ou peut être associé à des queues de collagène.

Sous-unité H : sous-unité catalytique contenant l'ancrage glycophospholipidique.

Sous-unité Q : sous-unité collagénique

Sous-unité P : sous-unité responsable de l'ancrage des tétramères amphiphiles.

GPI : ancrage glyco-phosphatidylinosito

P : peptide hydrophobe

L'AChE est donc exprimée sous plusieurs formes moléculaires dont les proportions sont spécifiques de chaque tissu, de chaque espèce et du stade de développement. On distingue ainsi des formes solubles intracellulaires, des formes sécrétées extracellulaires et trois types de formes membranaires ancrées par des dispositifs différents ont été décrites (voir Massoulié *et al.*, 1993 pour

revue). L'ancrage des formes G₂ amphiphiles dans la couche phospholipidique membranaire est principalement (mais pas exclusivement) du type glycoposphatidylinositol (GPI) et le décrochage de ce type moléculaire est spécifiquement obtenu par l'action de la phosphatidylinositolphospholipase C (PI-PLC) qui convertit ces formes amphiphiles en formes nonamphiphiles (i.e.hydrophiles). La nature de cette fixation membranaire confère à ces cholinestérases des comportements caractéristiques notamment des interactions fortes avec les micelles de détergents non ioniques tels que le Triton X-100 et X-114. Ces propriétés sont utiles dans les processus de séparation des différentes formes; il faut noter que certaines formes G₂ sont insensibles à la PI-PLC ce qui suggère un ancrage de nature différente. L'ancrage GPI a été mis en évidence à la fois chez les vertébrés et les invertébrés, notamment chez la torpille (Futerman *et al.*, 1985) et la drosophile (Fournier *et al.*, 1988a).

Les formes G₄ sont ancrées par l'intermédiaire d'un peptide hydrophobe de 20 kDa.(sous-unité P, voir figure 2).

Chez les vertébrés les formes asymétriques disposent d'une queue de collagène et existent majoritairement sous les formes A₈ et A₁₂ et dans une moindre mesure sous la forme A₄. Ce type d'ancrage associé à trois chaînes peptidiques organisées en triple hélices est spécifiquement coupé par la collagénase.

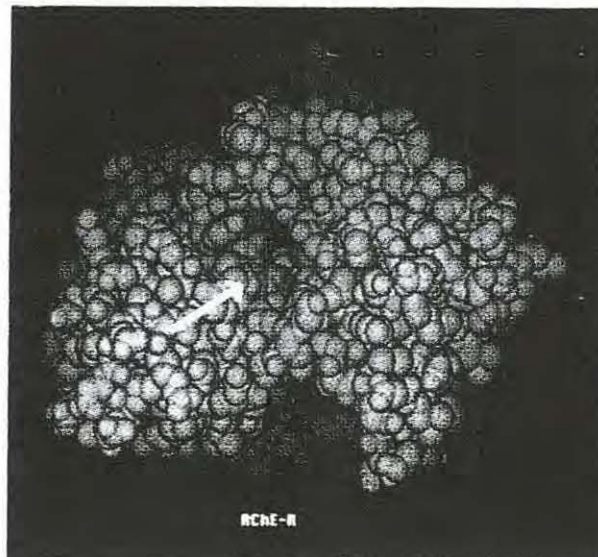


Figure 3 : Représentation spatiale de l'acétylcholinestérase localisant la gorge active (d'après Sussman, 1991)

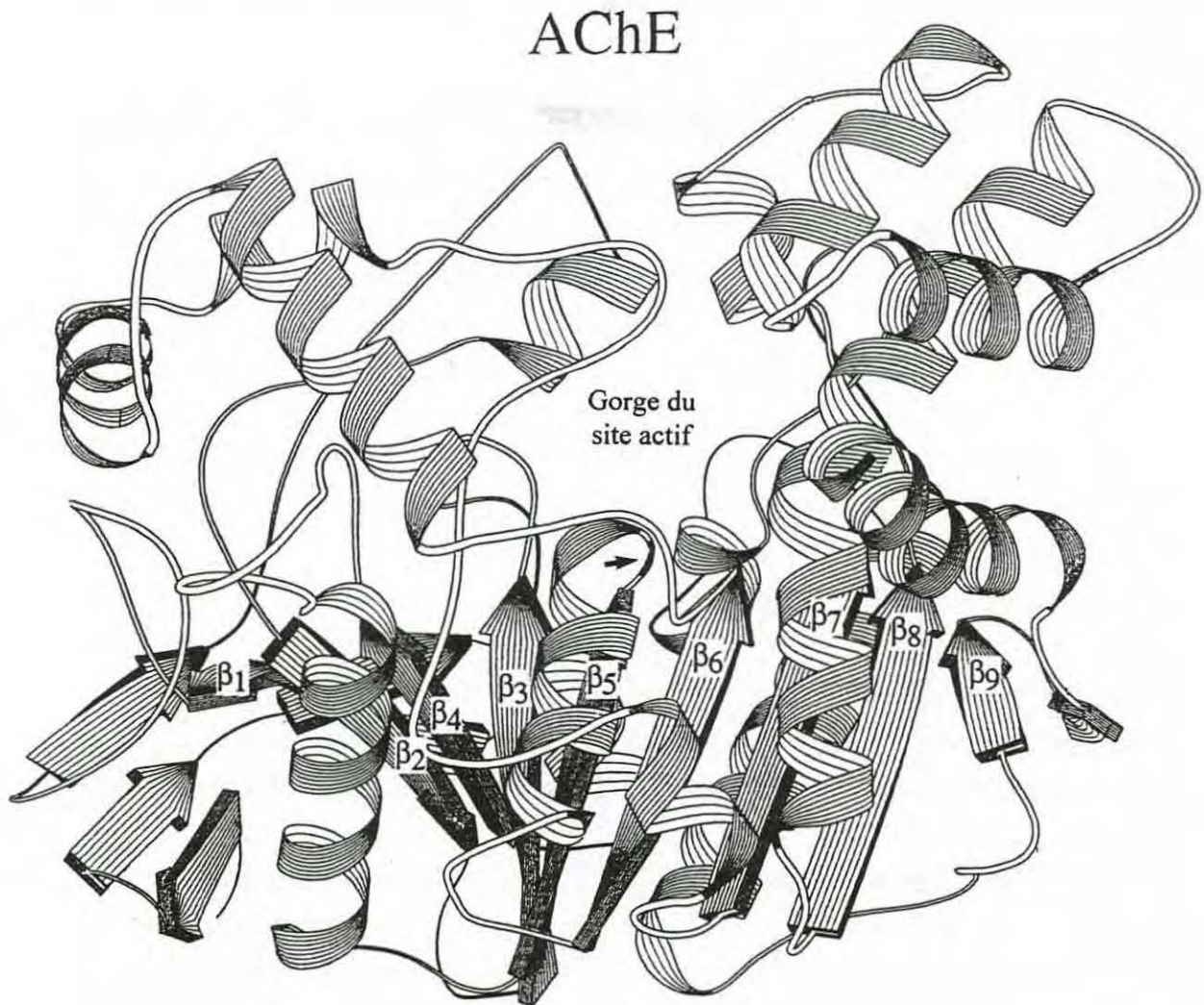


Figure 4 : Structure tri-dimensionnelle du dimère G2 de l'acétylcholinestérase de torpille (d'après Massoulié et al., 1993).

La flèche indique la position de la sérine active.

1-2-1-2. Structure de l'AChE chez les invertébrés

On notera que seules ont été identifiées les formes globulaires sous forme de monomère, dimère et tétramère de l'unité catalytique et que ces différentes formes, selon leur localisation dans l'organisme, ont des comportements hydrophile ou amphiphile. L'isoforme la plus commune dans la majorité des espèces est le dimère amphiphile lié par un ancrage glycophospholipidique à l'extérieur de la membrane cellulaire.

Chez les invertébrés, les structures quaternaires de l'AChE sont aussi des associations de la sous-unité catalytique semblables à celles trouvées chez les vertébrés (G₁, G₂ et G₄) mais il n'existe pas d'assemblage de formes

tétramériques entre elles. Les formes collagéniques asymétriques n'ont jamais été décrites chez les invertébrés.

Chez les insectes, l'AChE existe principalement sous une forme dimérique amphiphile ancrée à la membrane par un ancrage GPI (glycosylphosphatidylinositol). D'autres isoformes (essentiellement la forme G₁) ont été décrites qui dérivent de la forme principale G_{2m} (Fournier et al., 1987; Belzunces et al., 1988; Toutant et al., 1988b; Lenoir-Rousseaux et al., 1988.)

Chez les nématodes la présence de gènes multiples conduit à un polymorphisme plus complexe. Trois gènes distincts ont été révélés chez *Meloidogyne* qui codent pour 5 formes différentes (Chang et Opperman, 1991). Cinq formes ont aussi été décrites chez *Panagrellus redivivus* (Mulder et Bakker, 1992). Arpagaus et al. (1992) distingue des monomères, dimères, tétramères hydrophiles et un tétramère amphiphile qui constituent la classe A codée par le gène *ace-1* et des monomères et dimères amphiphiles de la classe B codée par *ace-2* chez *Steinernema carpocapsae*. Chez cette espèce la classe C n'a pas été identifiée alors qu'elle est importante par son activité chez *Meloidogyne* et qu'elle présente des particularités cinétiques, notamment de résistance aux inhibiteurs. Il faut noter que les deux formes amphiphiles distinctes de la classe A et B ne possèdent pas le même type d'ancrage.

Chez les autres familles d'invertébrés les cholinestérases sont moins connues. Chez la pieuvre (*Octopus vulgaris*), Talesa et al. (1995a) décrivent deux formes : une forme G₂ hydrophobe ancrée par un GPI et un tétramère hydrophile G₄. Le même auteur (1995b) signale la présence d'un monomère hydrophile (G₁) et d'un dimère amphiphile sensible à la PI-PLC (G_{2m}) chez la sangsue *Hirudo medicinalis*. Principato et al. (1988) rapportent l'existence d'une seule acétylcholinestérase chez le crustacé *Squilla mantis*. Cette enzyme est décrite comme un tétramère soluble (G₄) de $\cong 235\ 000$ kDa.

Dans le chapitre consacré au polymorphisme des cholinestérases chez les invertébrés et notamment chez l'huître commune (*Crassostrea gigas*) les différences qui caractérisent chacune des formes, plus particulièrement la sensibilité aux inhibiteurs, seront développées ainsi que l'intérêt pratique qui en découle dans l'utilisation des cholinestérases en tant que marqueur d'exposition.

1-2-2. Le site actif

Récemment, l'étude de la structure en trois dimensions du site estérasique par cristallographie, modélisation, mutagenèse dirigée et marquage d'affinité (Weise

et al., 1990; Hucho *et al.*, 1991; Sussman *et al.*, 1991; Massoulié *et al.*, 1993; Silman *et al.*, 1994; Taylor *et al.*, 1994; Ordentlich *et al.*, 1995) a clarifié notre compréhension des mécanismes moléculaires de l'activité catalytique de l'enzyme et de son inhibition notamment sur le rôle de chacun des acides aminés constituant le site catalytique.

Ce site actif, élément dynamique de l'AChE, est composé de deux sous-sites : le site estérasique et le site anionique. Le site estérasique est le site d'acétylation par l'acétylcholine du groupement hydroxyl (OH) de la sérine. L'AChE est une sérine hydrolase et la catalyse du substrat comprend une étape d'acylation-déacylation sur la sérine du site actif qui se situe en position variable selon les espèces (Tabl. 1). Les positions qui sont données dans cette description sont celles reconnues chez *T. californica* comme recommandé par Massoulié *et al.* (1992). La sérine en position 200 constitue avec une histidine (H₄₄₀) et un acide glutamique (E₃₂₇) la triade catalytique du site actif. Ces trois éléments sont situés à proximité du fond d'une gorge étroite et profonde de 20 Å (l'enzyme a une taille de 40Å) bordée par les cycles aromatiques de 14 acides aminés impliqués dans la diffusion de l'acétylcholine dans la gorge et qui représentent 40% de la surface de cette dernière (fig. 5). Le rôle fonctionnel de 9 de ces acides aminés aromatiques dans l'orientation du substrat est sur le point d'être élucidé.

Organisme	Position de la sérine active	Séquence
AChE (<i>Torpedo californica</i>)	200	TVTIFGE S AGGASVGM
AChE (<i>Torpedo marmorata</i>)	200	TVTILFGE S AGGASVGM
AChE (<i>Electrophorus</i>)	-	GGE S SEGAAC
AChE (venin de Cobra)	-	TVTILFGE S AGAASVGM
AChE (Bovine)	203	SVTILFGE S AGAASVGM
AChE (Cerveau humain)	209	SVTILFGE S AGAASVGM
AChE (Souris)	203	SVTILFGE S AGAASVGM
BuChE (Serum humain)	198	SVTILFGE S AGAASVSL
BuChE (Souris)	198	SVTILFGE S AGAASVSL
AChE (<i>Drosophila</i>)	237	WMTILFGE S AGSSSVNA

Tableau 1 : Position de la sérine active dans la séquence en acides aminés du site actif chez quelques espèces (d'après Hucho *et al.*, 1991).

AChE : acétylcholinestérase ; BuChE : butyrylcholinestérase.

A : alanine ; E : acide glutamique ; F : phénylalanine ; G : glycofolle ; I : isoleucine ; L : leucine ; M : méthionine ; N : asparagine ; S : sérine ; T : thréonine ; V : valine ; W : tryptophane.

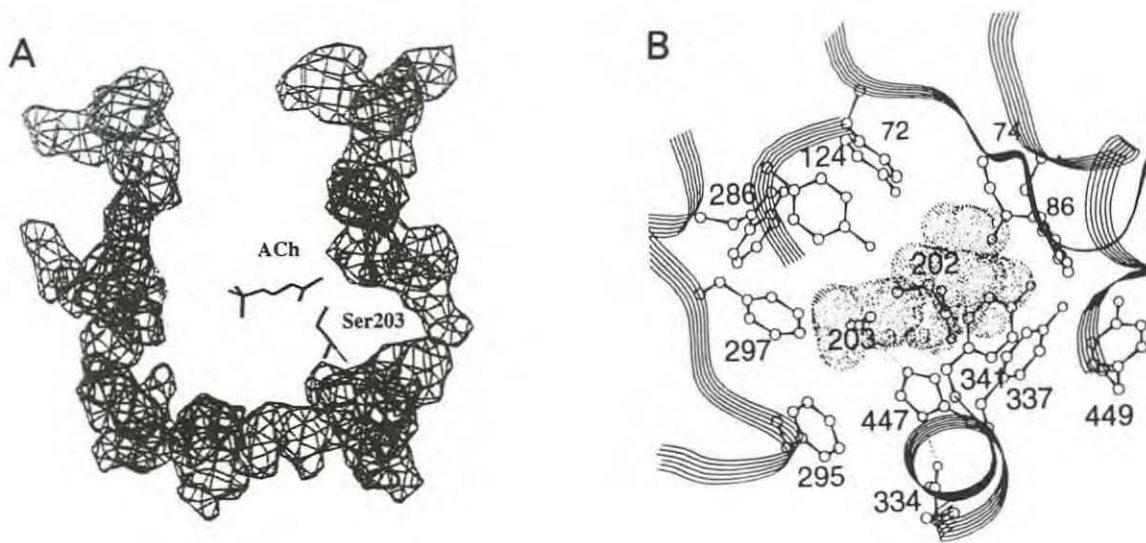


Figure 5 : Représentations de la gorge du site actif de l'acétylcholinestérase.

A : Gorge schématisée en coupe avec le substrat positionné. AChE humaine. (Modifié d'après Ordentlich et al., 1995).

B : Gorge en relief montrant la position des acides aminés de la triade catalytique (E334, H447 et S203), et du site de fixation (E202, Y341, Y337 et W86). AChE de mammifère. (d'après Taylor et al., 1994).

E : acide glutamique ; H : histidine ; S : sérine ; Y : thyrosine ; W : tryptophane.

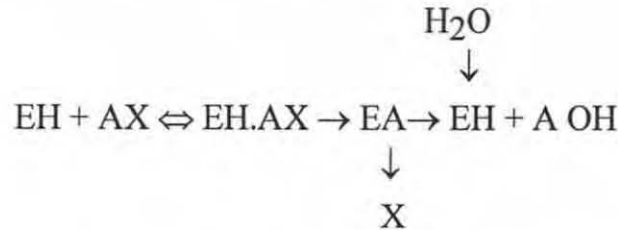
Le deuxième site indispensable à l'activité catalytique est le site anionique ou site de fixation de l'ammonium quaternaire de l'acétylcholine. Les deux sites, catalytique et anionique, sont extrêmement proches l'un de l'autre. Les propriétés de fixation du site anionique reposent sur le tryptophane en position 84 qui reconnaît la choline.

L'existence, en dehors du site actif de l'enzyme, d'autres sites de fixation dits "périphériques" sur lesquels l'acétylcholine se fixerait a été démontrée chez *T. californica*. Ces sites périphériques seraient impliqués dans les mécanismes d'inhibition par excès de substrat.

Ces données sont très récentes et restent encore discutées. Si les processus de fixation et diffusion du substrat dans l'enzyme commencent à être connus, de nombreux points demeurent obscurs notamment les mécanismes d'éjection du substrat hydrolysé.

1-2-3. L'hydrolyse de l'acétylcholine (ACh)

L'hydrolyse de l'acétylcholine se déroule selon le schéma général suivant:



Sur le site anionique de l'AChE (EH) vient se fixer l'ammonium quaternaire de l'acétylcholine (AX). Cette fixation oriente le substrat vers le site estérasique de l'enzyme. Le groupement ester de l'acétylcholine réagit alors avec l'hydroxyl de la sérine du site actif conduisant à la formation du complexe enzyme-substrat (EH.AX) particulièrement instable, puis d'une acétylcholinestérase acétylée (EA) très réactive. En présence d'eau, la déacétylation de l'enzyme aboutit à la libération de choline (X) et la formation d'acide acétique (A OH). Un nouveau cycle catalytique prend place.

1-3. Caractérisation de l'activité cholinestérasique chez plusieurs espèces marines

Pour de nombreux auteurs la mesure de l'activité acétylcholinestérase est le meilleur indice de contamination par les pesticides organophosphorés et carbamates (Holland *et al.*, 1967; Coppage et Braidech, 1976; Nemcsok *et al.*, 1985; Zinckl *et al.*, 1987; Galgani et Bocquené, 1988 ; Day et Scott, 1990). L'utilisation d'une activité enzymatique à des fins de diagnostic nécessite à la fois une connaissance approfondie de l'enzyme et de sa variabilité naturelle mais aussi une définition précise des conditions d'extraction, de conservation des extraits et de mesure de l'activité et son intégration dans des programmes de surveillance appliqués au milieu marin entraîne un certain nombre de contraintes telles que :

- la mise au point d'un outil analytique de dosage de l'activité AChE simple, sensible, rapide et économiquement raisonnable ;
- la nécessité de caractériser l'activité AChE chez les espèces dites sentinelles en fonction de la nature des zones à surveiller.

1-3-1. Matériels et méthodes:

Les conditions optimales de dosage ont été définies sur plusieurs espèces, ainsi que l'influence des conditions de stockage sur l'activité. Toutes les mesures d'activité AChE ont été réalisées grâce à l'adaptation de méthodes de mesure déjà décrites à l'utilisation du lecteur de plaques à microtitration.

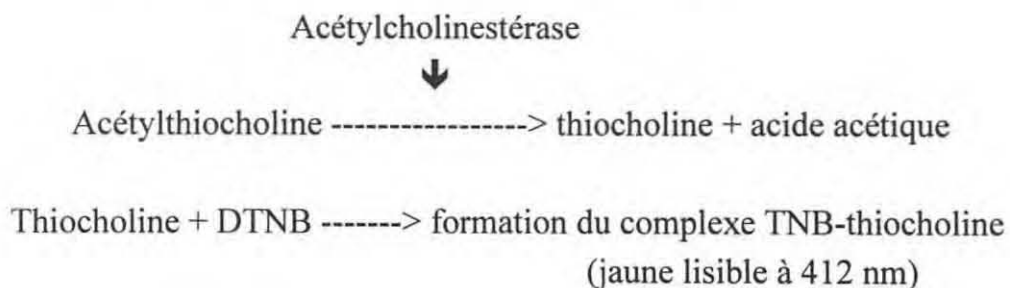
1-3-1-1. Le lecteur de microplaques

Les lecteurs de microplaques sont des spectrophotomètres ayant la possibilité de lire plusieurs densités optiques simultanément grâce à l'utilisation de barrettes de diodes et de microplaques de polystyrène. Le choix de la longueur d'onde de lecture se fait entre 340 nm et 690 nm grâce à des filtres interchangeable. La majorité des mesures colorimétriques et enzymatiques est ainsi transférable à la lecture de plaques. Les cuves réactionnelles sont des cupules de 400 µl. La plaque comporte généralement 96 puits. La lecture est donc verticale et nécessite un volume précis pour respecter un trajet optique de 1 cm (380 µl de milieu réactionnel dans les puits de 400 µl).

La possibilité de multiplier les mesures est particulièrement intéressante pour obtenir des valeurs statistiques des résultats et pour traiter les nombreux échantillons qu'impose un suivi à l'échelle océanique. Les possibilités d'adjoindre au lecteur des unités automatiques de distribution des réactifs, de gestion des résultats ou de pilotage du système en font un outil fiable et rapide, utilisable dans des conditions de terrain parfois difficiles où l'usage d'un spectrophotomètre classique est délicat (à bord d'un navire par exemple).

1-3-1-2. Mesure de l'activité AChE

De nombreuses méthodes de dosage de l'activité AChE sont disponibles mais il semble que la méthode colorimétrique décrite par Ellman *et al.* (1961) est aujourd'hui la plus utilisée. Cette méthode repose sur la mesure du produit de l'hydrolyse de l'acétylthiocholine (AcSCh) suivant la cinétique:



Dans des conditions d'excès de substrat, l'apparition de la thiocholine est proportionnelle à l'activité enzymatique. La fixation de l'ion dithiobisnitrobenzoate (DTNB) sur les groupements thiols (SH) de la thiocholine provoque l'apparition d'une coloration jaune dont l'intensité est fonction de l'activité AChE.

Transposée à l'utilisation de microplaques avec des puits de 400 μ l, la mesure se déroule de la manière suivante en introduisant successivement:

- 300 μ l de tampon 0.1 M TRIS HCl, pH 7.8.
- 20 μ l de réactif 0.01 M DTNB (0.5 mM final).
- 10 μ l de la solution enzymatique sous la forme d'un extrait brut.
- puis extemporanément 10 μ l de substrat 0.1 M AcSCh (2.6 mM final).

L'introduction du substrat déclenchant la réaction enzymatique, celle ci est suivie pendant quelques minutes en fonction de la vitesse de la réaction qui dépend elle même de l'espèce testée et des conditions d'extraction. L'activité spécifique est calculée, à partir du coefficient d'extinction moléculaire du complexe TNB-SCh ($13\ 600\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$) en nmoles de substrat hydrolysées par minute par milligramme de protéine (nmoles/mn/mg P.). La variation d'une unité de D.O. correspond à l'hydrolyse de 75 nmoles de substrat.

L'AChE est sensible à l'inhibition par excès de substrat à partir de 10 mM d'AcSCh. Tous les réactifs doivent être amenés à température contrôlée avant usage. Les puits sans extrait enzymatique (tampon, DTNB et AcSCh) sont utilisés pour calculer l'hydrolyse spontanée du substrat et les valeurs sont soustraites de la mesure des activités. Les conditions de stockage des réactifs sont les suivantes:

- -le substrat acétylthiocholine lyophilisé est conservé au congélateur et la solution mère 0.1 M est préparée avec de l'eau distillée extemporanément.
- - le réactif DTNB est préparé dans du tampon 0.1 M TRIS-HCl pH 8 ou 0.02 M Phosphate de sodium pH 8 et peut être conservé quelques jours à 4°C.

1-3-1-2. Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines selon la méthode de Bradford (1976) est basé sur la coloration bleue développée lors de la fixation du Bleu de Coomassie avec les groupements cationiques des protéines. Pour chacune des mesures 280 μ l de réactif de Bradford (acide phosphorique, méthanol et bleu de Coomassie) sont ajoutés à 100 μ l d'une dilution appropriée de l'échantillon à doser. Le réactif de Bradford est commercialement disponible sous forme concentrée et sa dilution dans de l'eau distillée est utilisable pendant deux semaines. Parallèlement et pour chaque série de mesure, une courbe d'étalonnage entre 1 et 10 μ g/ μ l de protéine

est préparée à partir de dilutions d'une solution de B.S.A. (Bovine Serum Albumin) comme protéine standard. La solution de B.S.A. réhydratée peut être conservée jusqu'à 60 jours à 4°C. L'utilisation du détergent Triton X 100 à 0.1% est compatible avec l'usage du réactif de Bradford. La couleur bleue développée par le Bradford au contact des protéines est stable pendant une heure et l'absorbance est lue à 595 nm. La concentration de l'échantillon en protéine est calculée à partir de la gamme d'étalonnage et corrigée en fonction d'éventuels facteurs de dilution. Les concentrations sont exprimées en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ou mg/ml du surnageant après extraction.

1-3-2. Résultats

1-3-2-1. Activités cholinestérasiques chez huit espèces marines.

Les activités cholinestérasiques ont été mesurées chez huit espèces marines, trois espèces de poissons : la plie (*Pleuronectes platessa*), le maquereau (*Scomber scomber*), la sole (*Solea solea*) et cinq espèces invertébrées : la crevette rose (*Palaemon serratus*), la crevette grise (*Crangon crangon*), la moule (*Mytilus edulis*), l'huître (*Crassostrea gigas*) et enfin un polychaete (*Nereis sp.*). Utilisant le tampon TRIS 0.1 M pH 8, les activités acétylcholinestérase (AChE), butyrylcholinestérase (BuChE) et propionylcholinestérase (PChE) ont été déterminées dans les muscles et cerveaux chez les vertébrés et dans les principaux organes des invertébrés après broyage et centrifugation à 10 000 g pendant 20 minutes. Les résultats apparaissent dans le tableau 2 en fonction de différents organes.

Dans la plupart des extraits, les chiffres montrent que l'activité la plus forte est l'activité acétylcholinestérasique. Elle apparaît très élevée dans le muscle et le cerveau de poisson, ces organes étant le siège privilégié des activités cholinestérasiques. Les extraits de muscle de maquereau et de plie montrent de très fortes activités (respectivement 1067 ± 11 nmoles/mn/mg P. et 994 ± 56 nmoles/mn/mgP.) de même que les extraits de cerveau, ce qui confirme que ce sont effectivement les organes les plus riches en activités cholinestérasiques compte tenu du fait que les activités propionylcholinestérasiques sont aussi élevées dans ces organes. Chez les invertébrés, le muscle abdominal de la crevette rose montre aussi une forte activité (609 ± 28 nmoles/mn/mg P.) bien que l'innervation des muscles chez les arthropodes ne soit pas de nature cholinergique. A l'opposé, les activités mesurées chez les mollusques (moule, huître) et chez le polychaete, sont très faibles quelque soit le substrat.

Espèce	Organe	Protéines mg.ml ⁻¹ d'extrait	Activité		
			AChE	BuChE	PChE
Plie	Muscle	10.64 ± 0.42	994 ± 56	155 ± 27	203 ± 23
	Cerveau	7.40 ± 0.14	446 ± 77	136 ± 26	-
Maquereau	Muscle	11.05 ± 0.35	1067 ± 11	47 ± 8	115 ± 19
	Cerveau	4.12 ± 0.10	904 ± 138	21 ± 5	-
		1.19 ± 0.35	258 ± 69	77 ± 5	-
Sole	Muscle	9.47 ± 0.45	249 ± 38	83 ± 22	354 ± 37
	Cerveau	4.93 ± 0.11	385 ± 41	9 ± 7	-
Moule	Hépatopancréas	8.76 ± 0.20	11 ± 1	4 ± 1	13 ± 3
	Manteau	7.69 ± 0.10	30 ± 4	7 ± 2	-
	Muscle adducteur	4.51 ± 0.21	33 ± 3	7 ± 3	-
	Branchies	1.98 ± 0.18	87 ± 9	28 ± 7	-
Huître	Hépatopancréas	6.25 ± 0.35	47 ± 5	6 ± 2	99 ± 21
	Muscle adducteur	4.70 ± 0.08	57 ± 8	6 ± 3	-
	Branchies	3.09 ± 0.16	63 ± 9	-	-
	Manteau	1.98 ± 0.06	69 ± 5	9 ± 7	-
Crevette rose	Céphalothorax	27.03 ± 0.22	46 ± 6	39 ± 7	-
	Muscle	10.32 ± 0.24	609 ± 28	108 ± 24	150 ± 22
	Hépatopancréas	7.35 ± 1.47	104 ± 14	-	-
Crevette grise	Céphalothorax	9.38 ± 0.72	183 ± 32	54 ± 12	-
	Muscle	9.35 ± 0.6	73 ± 12	31 ± 6	25 ± 4
	Hépatopancréas	8.04 ± 0.41	-	-	-
Néréis	Animal entier	2.61	52 ± 7	17 ± 4	-

Tableau 2 : Distribution des activités d'hydrolyse de trois substrats par les cholinestérases dans différents organes de huit espèces marines en fonction.

Les activités spécifiques sont données en nmoles de substrat hydrolysées par minute par mg de protéine. Les valeurs sont des moyennes ± E.T. sur 4 déterminations.

1-3-2-2. Conservation des extraits

Différentes conditions de conservation des extraits bruts ont été testées pour déterminer les conditions optimales qui éviteraient toute altération des activités avant le dosage. Deux méthodes de conservation ont été comparées aux activités

des extraits frais : la congélation des extraits à -20°C pendant 30 jours et la lyophilisation. Il apparaît que les concentrations en protéines des extraits ne sont pas modifiées de manière importante mais que les activités enzymatiques sont fortement perturbées par la lyophilisation et dans une moindre mesure par la congélation notamment chez les vertébrés (tableau 3).

Au vu de ces données il est conseillé de ne travailler que sur des extraits bruts frais.

		Protéines dans l'extrait mg.ml^{-1}	Activité spécifique AChE
Maquereau (<i>Scomber scomber</i>)	Frais	28.09	348
	Congelé	28.75	236
	Lyophilisé	27.13	141
Plie (<i>Pleuronectes platessa</i>)	Frais	15.12	1225
	Congelé	14.5	840
	Lyophilisé	14.01	850
Crevette rose (<i>Palaemon serratus</i>)	Frais	21.37	119
	Congelé	22.22	125
	Lyophilisé	24.04	97
Moule (<i>Mytilus edulis</i>)	Frais	19.60	117
	-	-	-
	Lyophilisé	17.56	145

Tableau 3 : Effets de la congélation et de la lyophilisation sur la stabilité de hydrolyse de l'AcSCh par des extraits bruts de différents organismes marins.

1-3-2-3. Détermination d'une température optimale de mesure (voir la publication 1).

L'activité AChE de cinq espèces a été mesurée à six températures comprises entre 10°C et 48°C . Excepté le cas des extraits de moule où l'activité continue à croître au delà de 48°C , les extraits des autres organismes montrent une courbe d'activité classique en fonction de la température qui fait apparaître une large plage d'activité optimale située entre 20°C et 34°C pour les extraits de muscle de poisson, et entre 20°C et 42°C pour l'extrait de crevette. L'activité AChE d'extraits de poisson décroît rapidement à des températures du milieu réactionnel supérieures à 34°C .

Ces résultats impliquent que les dosages de l'activité AChE doivent être réalisés à une température ambiante comprises entre 20°C et 25°C . Le maintien du milieu

réactionnel à une température constante (bain-marie) prise dans cette gamme de valeurs est impératif.

1-3-2-4. Variations naturelles de l'activité AChE chez quelques espèces marines

La connaissance la plus complète des variations naturelles d'un mécanisme biologique ou biochimique est indissociable de la notion de surveillance biologique et il faut impérativement distinguer les effets dus aux contaminants des variations physiologiques naturelles. C'est une problématique très complexe car elle fait intervenir des mécanismes multiples et mal connus dont les effets peuvent être additifs ou antagonistes. On admet que les variations naturelles sont de deux ordres :

- - celles qui ont pour origine une différence entre les individus d'une même espèce, ce sont les variations intraspécifiques liées à certains états physiologiques tels que le sexe, l'âge ou la période de reproduction. Ces paramètres sont connus pour engendrer des modifications sensibles de certains processus biologiques et biochimiques.
- - celles qui sont dues à des pressions au niveau d'une population et qui sont essentiellement liées aux modifications des paramètres environnementaux.

L'influence de l'environnement est capitale et les paramètres physicochimiques du milieu tels que la température peuvent jouer un rôle important notamment dans les milieux aquatiques.

Il est néanmoins possible d'évaluer les variations intraspécifiques d'une activité enzymatique en mesurant celle ci sur un nombre statistiquement significatif d'individus d'une même population et d'une même aire géographique.

Les variations saisonnières d'une activité enzymatique chez une espèce donnée peuvent être appréhendées en réalisant un suivi régulier de cette activité. Ainsi les variations intraspécifiques chez la Limande (*Limanda limanda*) ont été déterminées à partir de la capture dans le milieu de 55 limandes sur la même zone de pêche. Ces animaux, de taille homogène (20 cm) et des deux sexes, sont sacrifiés et l'activité AChE musculaire est immédiatement mesurée à bord du navire. Sur un intervalle de confiance à 95% l'activité AChE moyenne calculée sur cette population ($N = 55$) est de 172 ± 8 nmoles AcSCh hydrolysées/mn/mg de protéine ($m \pm s/\sqrt{N}$). Les activités AChE des limandes mâles et femelles ont été comparées sur deux zones distinctes (Manche, Mer du Nord) et il n'apparaît aucune différence significative entre les deux sexes (Galgani et Bocquené, 1992a) ce qui est confirmé pour la truite par Payne *et al.* (1995). Les suivis de l'activité AChE spécifique de la plie (*Pleuronectes platessa*) et de la crevette rose (*Palaemon serratus*) sur une période d'un an mettent en évidence la relation

directe entre la température du milieu et le niveau d'activité AChE, ce qui confirme les résultats des travaux de Hogan (1970). En revanche les mêmes mesures effectuées en Rade de Brest sur un mollusque bivalve, la coquille St Jacques (*Pecten maximus*) ont montré que chez cette espèce les activités se maintiennent à un niveau comparable quelque soit la température de la mer.

Au cours d'une campagne en Méditerranée, l'abondance du mullet (*Mullus barbatus*) sur une même zone a permis de déterminer l'activité AChE en fonction de la taille chez cette l'espèce. Les résultats sont donnés par la figure 6 et montrent chez *M. barbatus* une activité inversement proportionnelle à la taille, ainsi les animaux de taille 16-18 cm qui n'ont été capturés que sur les trois stations Milazzo (Sicile), Civitavecchia (côte Ouest de l'Italie) et Santa Manza (Sud Corse) présentent des activités AChE très voisines de l'ordre de 112.5 nmoles/mn/mg P (respectivement 111.5 ± 7 , 112.1 ± 5.8 et 108.7 ± 5.0 nmoles/mn/mg P). Les individus plus jeunes, de classe de taille 12-14 cm montrent des activités AChE plus élevées ($p < 0.001$). Ces informations sont confirmées par les observations faites sur le muscle d'autres espèces telles que le callionyme (*Callionymus lyra*) (fig. 7) et le serran chèvre (*Serranus cabrilla*). Au contraire les activités AChE mesurées sur le cerveau de callionyme ne montrent aucune différence significative en fonction de la taille de l'animal (fig.8).

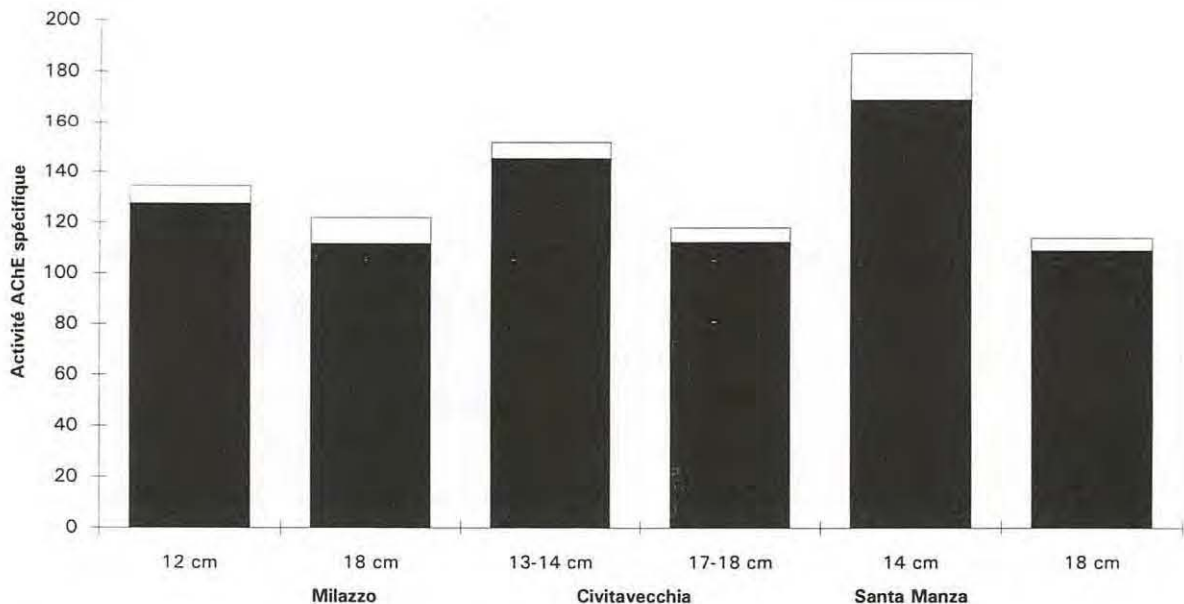


Figure 6 :Hydrolyse de l'AcSCh en fonction de la taille chez *M. barbatus* sur trois stations différentes.Les activités sont exprimées en nmoles de substrat hydrolysées par minute et par mg de protéine.

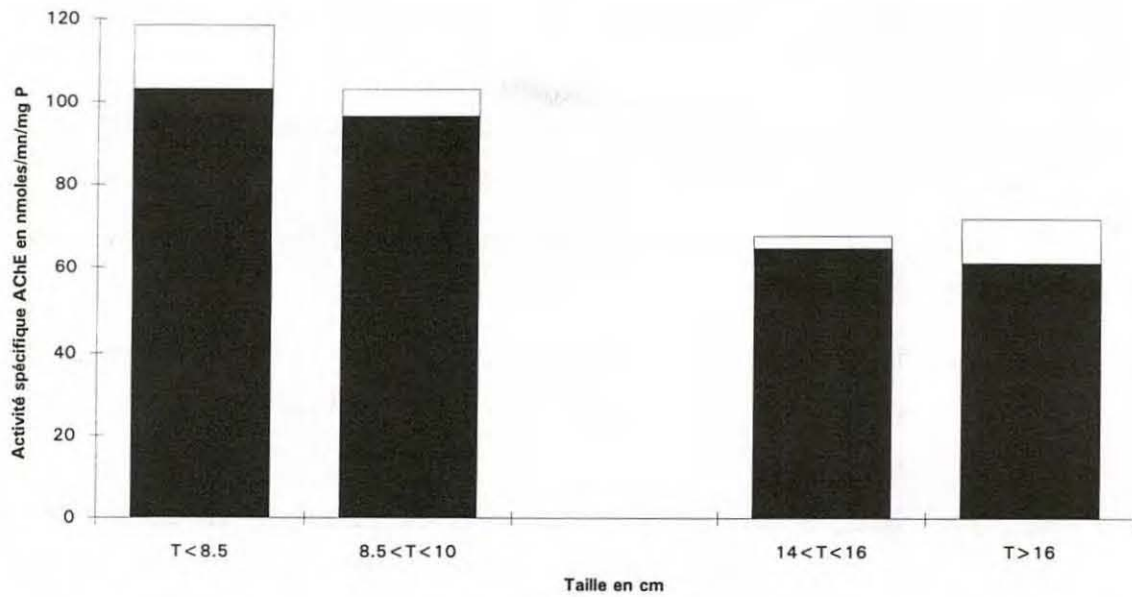


Figure 7 : Hydrolyse de l'AcSCh en fonction de la taille dans le muscle dorsal chez *Callionymus lyra*.

Les activités sont exprimées en nmoles de substrat hydrolysées par minute et par mg de protéine. La classe de taille comprise entre 10 et 14 cm n'a pas été capturée à cette période.

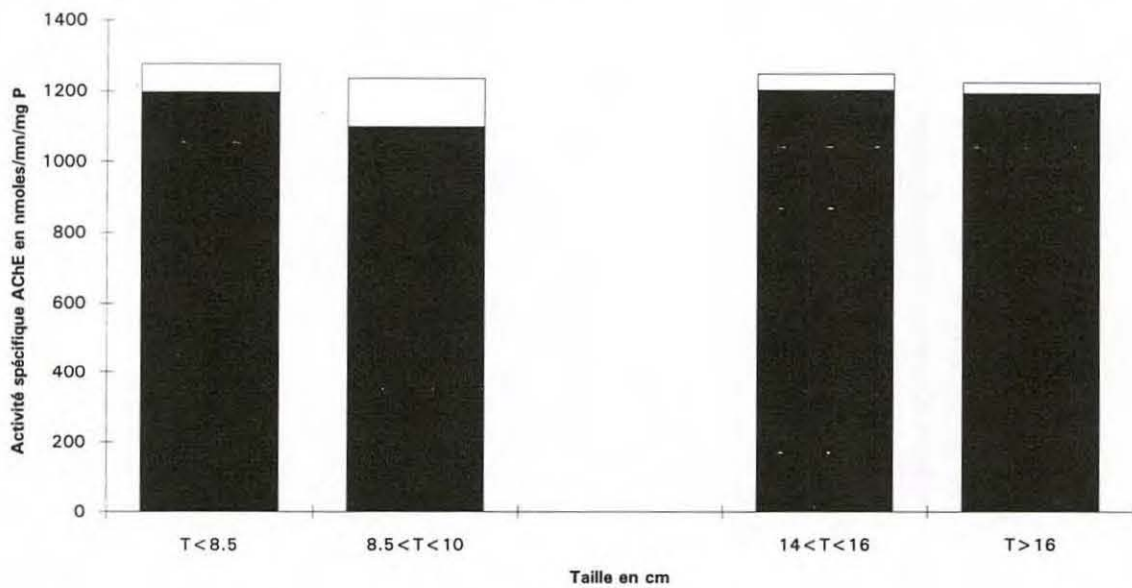


Figure 8 : Hydrolyse de l'AcSCh en fonction de la taille dans le cerveau chez *Callionymus lyra*.

Les activités spécifiques sont exprimées en nmoles de substrat hydrolysées par minute et par mg de protéine. La classe de taille comprise entre 10 et 14 cm n'a pas été capturée à cette période.

L'ensemble de ces données permet un certain nombre de remarques sur les contraintes appliquées à l'utilisation de la mesure des cholinestérases d'organismes marins :

- tous les organismes testés présentent une activité AChE mesurable mais la variation inter-espèces peut être considérable ;
- les muscles et les cerveaux de poisson montrent les activités les plus fortes ;
- la température optimale de mesure de l'activité se situe entre 20°C et 34°C mais seules les activités mesurées à la même température peuvent être comparées ;
- les variations temporelles de l'activité enzymatique et celles liées notamment à la taille contraignent à procéder à des prélèvements les plus simultanés dans le temps, sur une population de taille parfaitement homogène.

PUBLICATION 1 :

**Characterization and Assay Conditions for Use of AChE Activity from
Several Marine Species in Pollution Monitoring**

Marine Environmental Research, 30 (1990) 75-89



Characterization and Assay Conditions for Use of AChE Activity from Several Marine Species in Pollution Monitoring

Gilles Bocquené, François Galgani & Philippe Truquet

Laboratoire Effets Biologiques des Nuisances, DERO—IFREMER,
Rue de l'Île d'Yeu, BP 1049, 44037 Nantes Cedex 01,
France

(Received 18 August 1989; revised version received 9 January 1990;
accepted 1 February 1990)

ABSTRACT

Acetylcholinesterase (AChE) activity was investigated in eight marine species of potential value for monitoring pesticides. AChE, BUCHE and PChE activities were compared, and optimal conditions of extraction, storage and measurement were determined. TRIS extract buffer 0.1 M, pH 8, was found to provide good specific production. AChE activity was not altered by freezer storage at -20°C. Optimal measurement temperatures ranged from 20 to 34°C, and pH was optimal between 6.5 and 8.5. To monitor the effects of anticholinesterase compounds, it is preferable to measure inhibition on plaice (Pleuronectes platessa) and common prawn (Palaemon serratus) which have high activity levels.

INTRODUCTION

During various international workshops (ICES Denmark 1978, IOC Norway 1986), changes in serum enzymes have been considered as means of detecting pollutants and determining their effect on marine organisms. It is evident that validation of this technique would provide an important monitoring tool. However, one major difficulty in using enzyme changes is to characterize the enzyme and determine its normal variability, a procedure which depends on the availability of basic biochemical information.

Gilles Bocquené et al

Evaluation of a species to be used for a monitoring programme requires basic knowledge about its ecology, distribution area and physiology. Moreover, when a biochemical parameter is used, further characterization of these properties is necessary.

Inhibition of acetylcholinesterase (AChE) (E.C. 3.1.1.7) activity in cholinergic areas of nerve tissue has been proposed as evidence of organophosphate and carbamate chemical poisoning (Coppage *et al.*, 1975; Holland *et al.*, 1987; Lee & Serrat, 1977; Zinckl *et al.*, 1987). This means that AChE measurements are probably the best specific index of pesticide poisoning in most marine species (Galgani, 1988). However, before a marine organism can be used as an indicator of environmental contamination resulting from an AChE-inhibiting pesticide, more data must be obtained on the nature of the enzyme.

The present paper reports on AChE characteristics in different marine species. Determinations were done concerning extract buffer, temperature effect on AChE activity measurements, pH activity dependence, enzyme stability and ion concentration effects. Investigations were carried out on three species of fish: plaice—*Pleuronectes platessa*, mackerel—*Scomber scomber* and sole—*Solea solea*; and five species of invertebrates; common prawn—*Palaemon serratus*; sand shrimp—*Crangon crangon*; common mussel—*Mytilus edulis*; oyster—*Crassostrea gigas* and polychaete—*Nereis* sp.

MATERIALS AND METHODS

Plaice was obtained during a scientific cruise in a low pesticide contamination area of the English Channel (off St Brieuç, France). All other species were obtained alive directly from the fish market in Nantes, France.

Extraction

Eight buffers were tested. Fresh tissues were suspended in buffer (2/1.V/W) and homogenized for one minute using an Ultra Turrax. Extracts were then centrifuged at 16 000 g for 30 min (Kontron 40 1 centrifuge). Supernatants were immediately frozen at -20°C before use as enzyme solution.

Protein determination

Bradford's method (1976) was employed for quantitative determination of proteins, using bovine serum albumin (BSA) as standard. All assays were done in quadruplicate.

Use of AChE activity in pollution monitoring of marine species

Assay of enzymatic activity

Acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BUCHE) and propionylcholinesterase (PChE) were determined spectrophotometrically using respectively, acetylthiocholine, butyrylthiocholine and propionylthiocholine as substrates. The method of Ellman *et al.* (1961) was used, as modified for microtitration plate reading (Galgani & Bocquene, 1988). For each microplate well, 300 μ l of TRIS buffer 0.1 M, pH 8, 20 μ l of dithiobis nitrobenzoic acid (DTNB 0.01M) and 10 μ l of enzyme solution were successively added. Substrate (10 μ l, 0.1M) was added before enzymatic reaction was started, and optical density (OD) was monitored on a microplate reader (Titerteck MCC 340) at 405 nm. One unit of AChE activity is the variation of 0.001/OD. Results are given as units min^{-1} or units $\text{min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ for specific activities. All assays were done in quadruplicate.

Effect of mineral ions

The effect of mineral ions was tested on AChE activity from four species. Tissue extracts were dialyzed for 48 h before assays were carried out. Ionic solutions were incubated with the enzyme solution for 40 min before reaction was started by addition of substrate.

Storage and stability

Two storage methods for animal extracts (freezing at -20°C and freeze-drying) were investigated, and comparisons of effects of time, temperature and pH on AChE activity were compared with results obtained for extracts from fresh animals.

Determination of optimal temperature and pH

Assays of enzyme activity were performed at different temperatures and pH to determine optimal measurement conditions. Spontaneous hydrolysis of the substrate was measured in basic pH conditions.

RESULTS

Animals

Protein content and the specific enzyme activities of AChE, BUCHE and PChE were determined for each of the eight species and/or each organ tested

TABLE 1
 Proteins and Cholinesterase Activities from Tissues of Different Marine Species

	Protein in extract (mg.ml ⁻¹)	AChE activity in protein (U.ng ⁻¹)	BUChE activity in protein (U.ng ⁻¹)	Propionyl cholinesterase in protein (U.mg ⁻¹)
<i>Pleuronectes platessa</i>				
Muscle	10.64 ± 0.42	13 252 ± 746	2 065 ± 358	2 707 ± 306
Liver	9.82 ± 0.14	2 766 ± 479	1 502 ± 260	—
Brain	7.40 ± 0.14	5 946 ± 1 020	1 807 ± 346	—
Heart	4.40 ± 0.60	1 875 ± 210	733 ± 130	—
<i>Scomber scomber</i>				
Blood	13.33 ± 0.14	1 600 ± 22	737 ± 124	—
Muscle	11.05 ± 0.35	14 230 ± 142	627 ± 111	1 538 ± 253
Heart	8.03 ± 0.15	507 ± 80	—	—
Brain	4.12 ± 0.10	12 961 ± 1 845	281 ± 73	—
	1.19 ± 0.35	3 445 ± 924	1 029 ± 63	—
<i>Solea solea</i>				
Heart	10.16 ± 0.97	254 ± 31	131.4 ± 62	—
Muscle	9.47 ± 0.45	3 315 ± 507	1 102 ± 297	4 725 ± 496
Brain	4.93 ± 0.11	5 131 ± 548	117 ± 94	—
<i>Mytilus edulis</i>				
Whole animal	9.99 ± 0.57	311 ± 29	44 ± 20	175 ± 45
Hepatopancreas	8.76 ± 0.20	151 ± 14	49 ± 18	—
Mantle	7.69 ± 0.10	394 ± 51	98 ± 29	—
Adducent muscle	4.51 ± 0.21	440 ± 43	100 ± 43	—
Gill	1.98 ± 0.18	1 155 ± 114	372 ± 98	—
<i>Crassostrea gigas</i>				
Whole animal	4.07 ± 0.28	1 925 ± 305	439 ± 212	1 326 ± 275
Hepatopancreas	6.25 ± 0.35	632 ± 66	78 ± 27	—
Adducent muscle	4.70 ± 0.08	757 ± 112	77 ± 45	<213
Gill	3.09 ± 0.16	841 ± 123	—	—
Mantle	1.98 ± 0.06	914 ± 68	126 ± 93	—
<i>Palaemon serratus</i>				
Cephalothorax	27.03 ± 0.22	609 ± 85	518 ± 100	—
Whole animal	16.24 ± 0.94	1 686 ± 50	687 ± 180	1 995 ± 289
Muscle	10.32 ± 0.24	8 125 ± 380	1 438 ± 314	—
Eggs	8.63 ± 0.10	342 ± 34	—	—
Hepatopancreas	7.35 ± 1.47	1 394 ± 188	—	—
<i>Crangon crangon</i>				
Cephalothorax	9.38 ± 0.72	2 438 ± 426	720 ± 159	—
Muscle	9.35 ± 0.6	973 ± 166	418 ± 76	334 ± 53
Whole animal	8.08 ± 1.2	1 585 ± 348	282 ± 40	3 292 ± 470
Hepatopancreas	8.04 ± 0.41	—	—	—
Eggs	4.95 ± 0.005	396 ± 50	77 ± 59	—
<i>Nereis sp.</i>				
Whole animal	2.61	690 ± 94	220 ± 57	—

Use of AChE activity in pollution monitoring of marine species

(Table 1) in order to eliminate tissues or species not offering sufficient specific activity.

The highest enzyme activity was found for AChE, with the most elevated values occurring in fish—especially in muscle and brain which are preferred sites of neuromuscular activity.

Plaice and mackerel muscle showed the highest AChE activity values, respectively 13 250 and 14 230 U mg⁻¹ protein. AChE concentration was also high (8125 U mg⁻¹ protein) in common prawn muscle but much lower in sand shrimp muscle. The oyster, common mussel and polychaete had very low activity (less than 2000 U mg⁻¹ protein).

Extraction

The amount of enzymatic activity which could be extracted by the eight different buffers was investigated for *Mytilus edulis* (Table 2). Although specific activities were moderate, the best protein production was obtained in TRIS buffer 0.1 M, pH 8, Table 2 shows that H₂O gave very low production and should be excluded. Our results are similar to those obtained previously in studies using phosphate buffer (Ellman *et al.*, 1961; Lundin, 1967; Winners *et al.*, 1977), TRIS buffer (Holmes & Whitt, 1970; Finlayson & Rudnicki, 1985; Zinkl *et al.*, 1987) or a combination of phosphate and TRIS buffer (Wang & Murphy, 1982).

Storage of animals before extraction

Table 3 indicates the protein concentrations and AChE activities of fresh as compared to frozen and lyophilized animal extracts. In all three cases, the amount of protein concentration was not significantly affected by the

TABLE 2
Protein AChE and BUCHE Activities using Different Extraction Buffers in *Mytilus edulis*
(means ± SD)

	Buffers					
	0.1M pH 8 TRIS	H ₂ O	0.25M Saccharose	0.02M pH 7.5 Phosphate	50% Glycerol	Tween
Protein mg ml ⁻¹	9.99 ±0.57	4.50 ±0.63	6.05 ±0.15	6.01 ±0.16	7.23 ±0.19	7.57 ±0.37
AChE activity U mg ⁻¹ protein	1 821 ± 70	2 150 ± 111	2 160 ± 132	2 200 ± 50	1 560 ± 110	1 180 ± 132
BUCHE activity U mg ⁻¹ protein	210 ± 50	355 ± 22	826 ± 33	299 ± 66	207 ± 28	211 ± 30

Gilles Bocquené et al

TABLE 3
Proteins and AChE Activity Using Different Storage Methods

		Proteins in extract $mg\ ml^{-1}$	AChE activity in protein $U\ mg^{-1}$
<i>Scomber scomber</i>	Fresh	28.09	4.645
	Frozen	28.75	3.148
	Lyophilized	27.13	1.879
<i>Pleuronectes platessa</i>	Fresh	15.12	16.336
	Frozen	21.37	7.600
	Lyophilized	14.01	11.340
<i>Paluemon serratus</i>	Fresh	21.37	1.591
	Frozen	22.22	1.665
	Lyophilized	24.04	1.289
<i>Mytilus edulis</i>	Fresh	19.60	1.556
	—	—	—
	Lyophilized	17.56	1.936

storage method. However, enzyme activity was slightly reduced by freezing at $-20^{\circ}C$ and strongly disturbed when lyophilized.

Extract stability

Effects on AChE activity were investigated with respect to storage temperature, pH and time (Figs 1, 2, 3). Although a $45^{\circ}C$ temperature quickly denatured the enzyme (no activity was found in any of the experimental situations), there was an important difference in AChE behavior between fish (plaice and mackerel) and invertebrate (prawn and mussel) extracts. AChE activity of common prawn and mussel was apparently only slightly altered at temperatures of 4 and $20^{\circ}C$, regardless of storage pH. However, fish AChE was much more affected by storage pH since a considerable reduction in activity was observed at an acid pH of 4.5, with about 80% loss of activity in plaice muscle and mackerel brain at 4 and $20^{\circ}C$. Nonetheless, after 30 days, AChE activity in fish brain and muscle was less affected by storage in buffer at these temperatures. For slightly basic pHs (8 and 9.1), the enzymatic activity of fish extracts showed no significant differences; activity loss was greater in both cases at $20^{\circ}C$ than at $4^{\circ}C$.

Determination of optimal temperature (Fig. 4)

When acetylthiocholine was used as substrate in TRIS buffer 0.1 M, pH 8, the highest activity occurred within a wide temperature range of $20-34^{\circ}C$ for

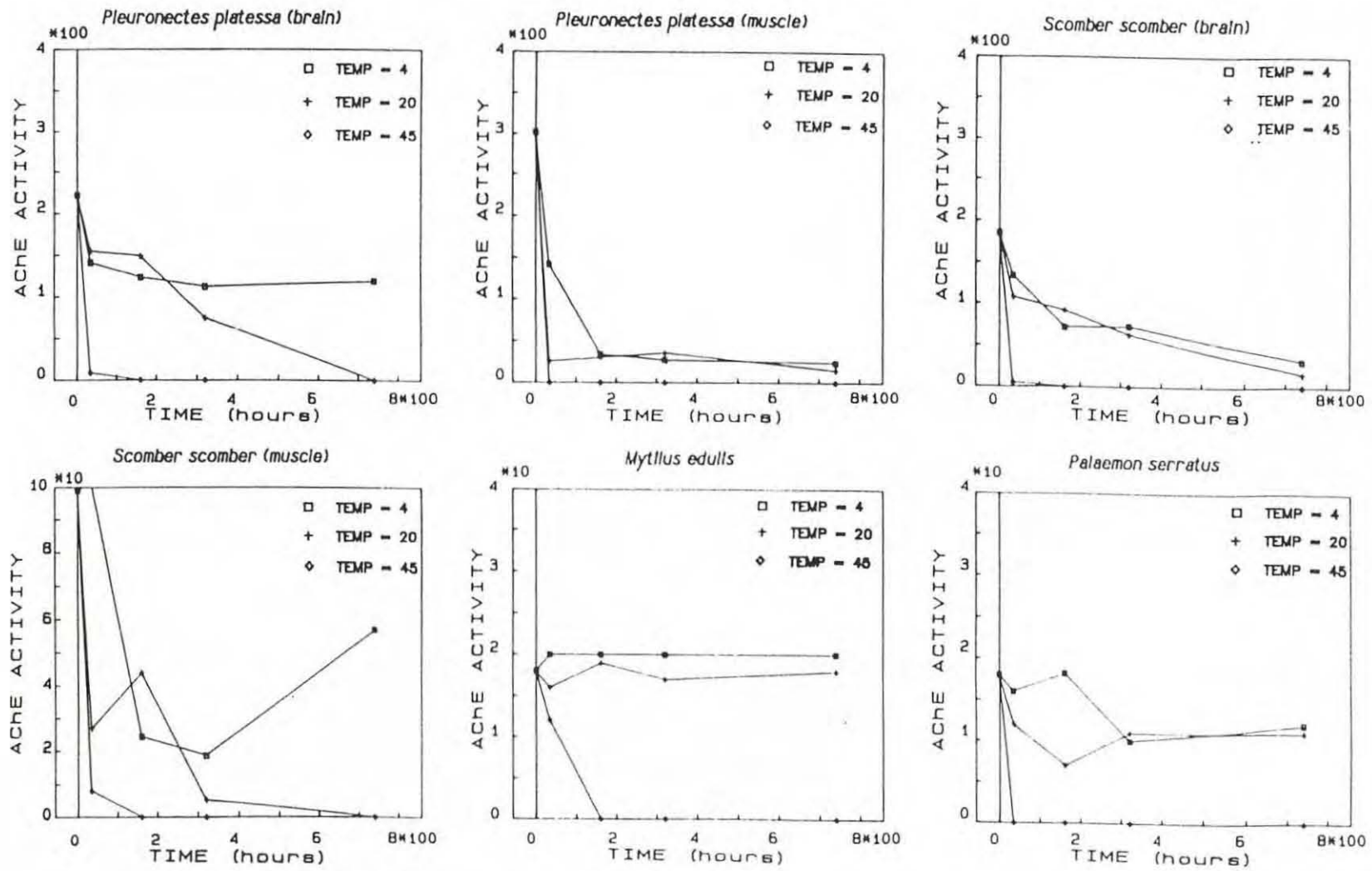


Fig. 1. Effect of storage time and temperature on AChE activity, pH = 4.5.

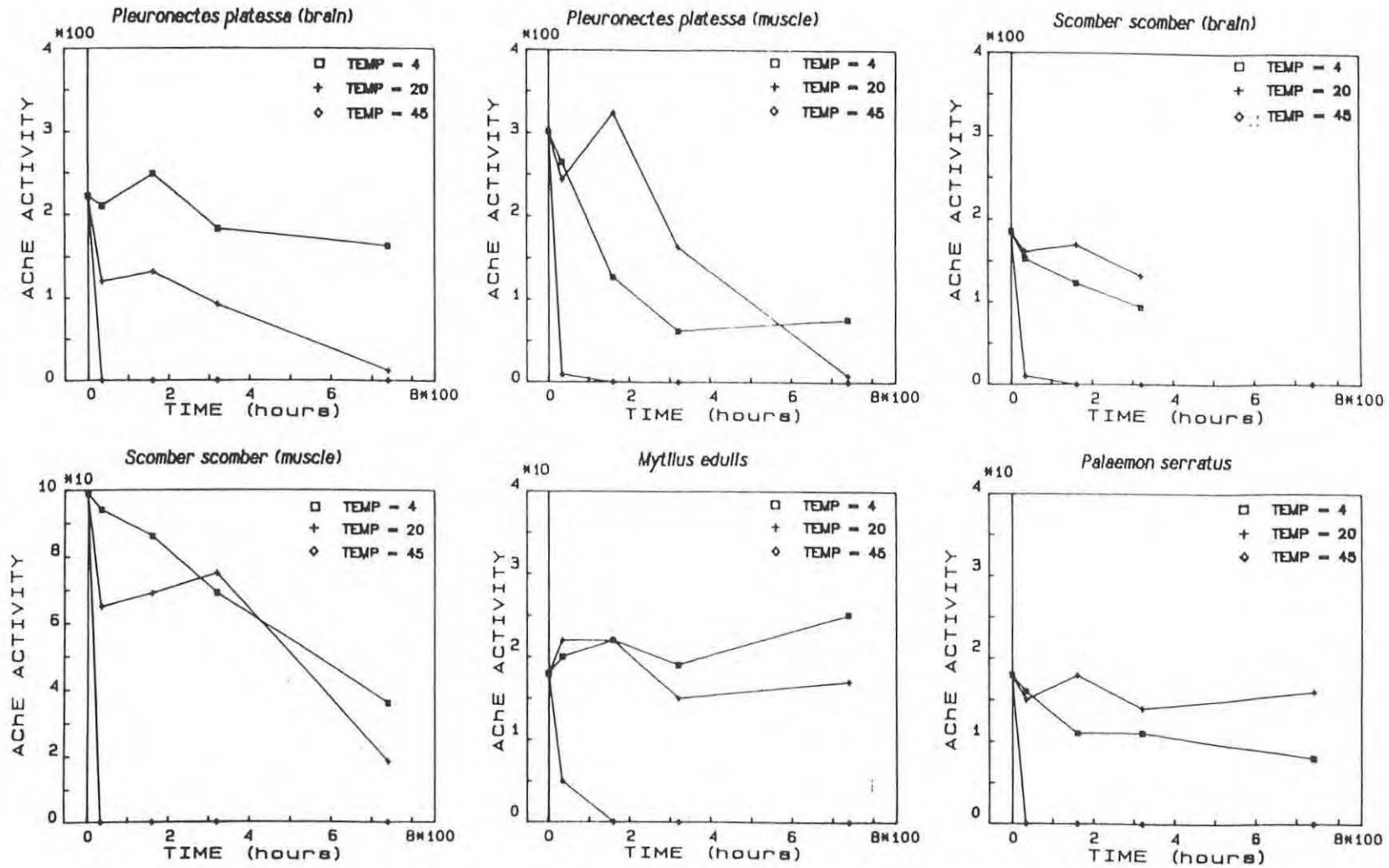


Fig. 2. Effect of storage time and temperature on AChE activity, pH = 8.

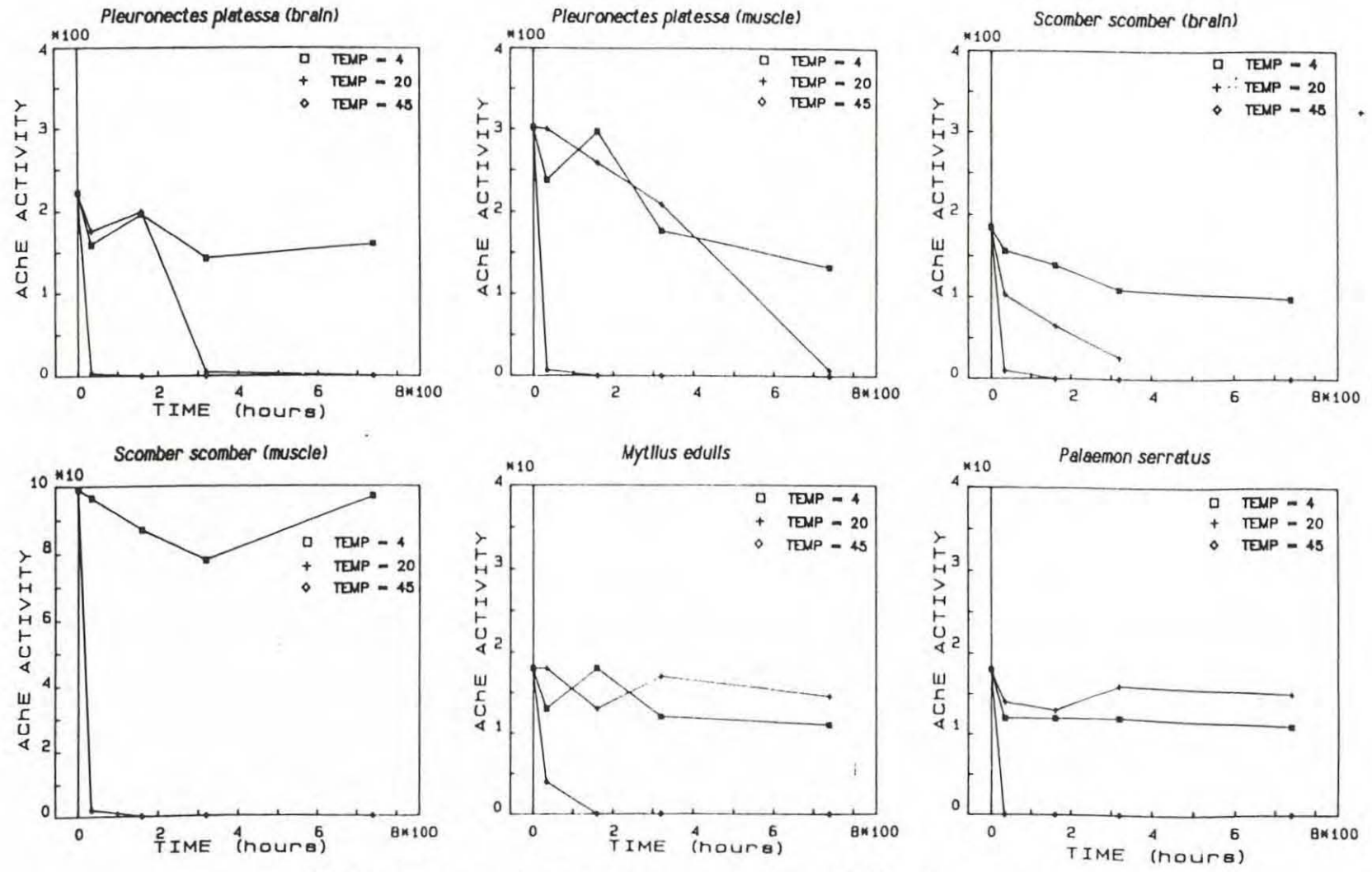


Fig. 3. Effect of storage time and temperature on AChE activity, pH = 9.1.

Gilles Bocquené et al

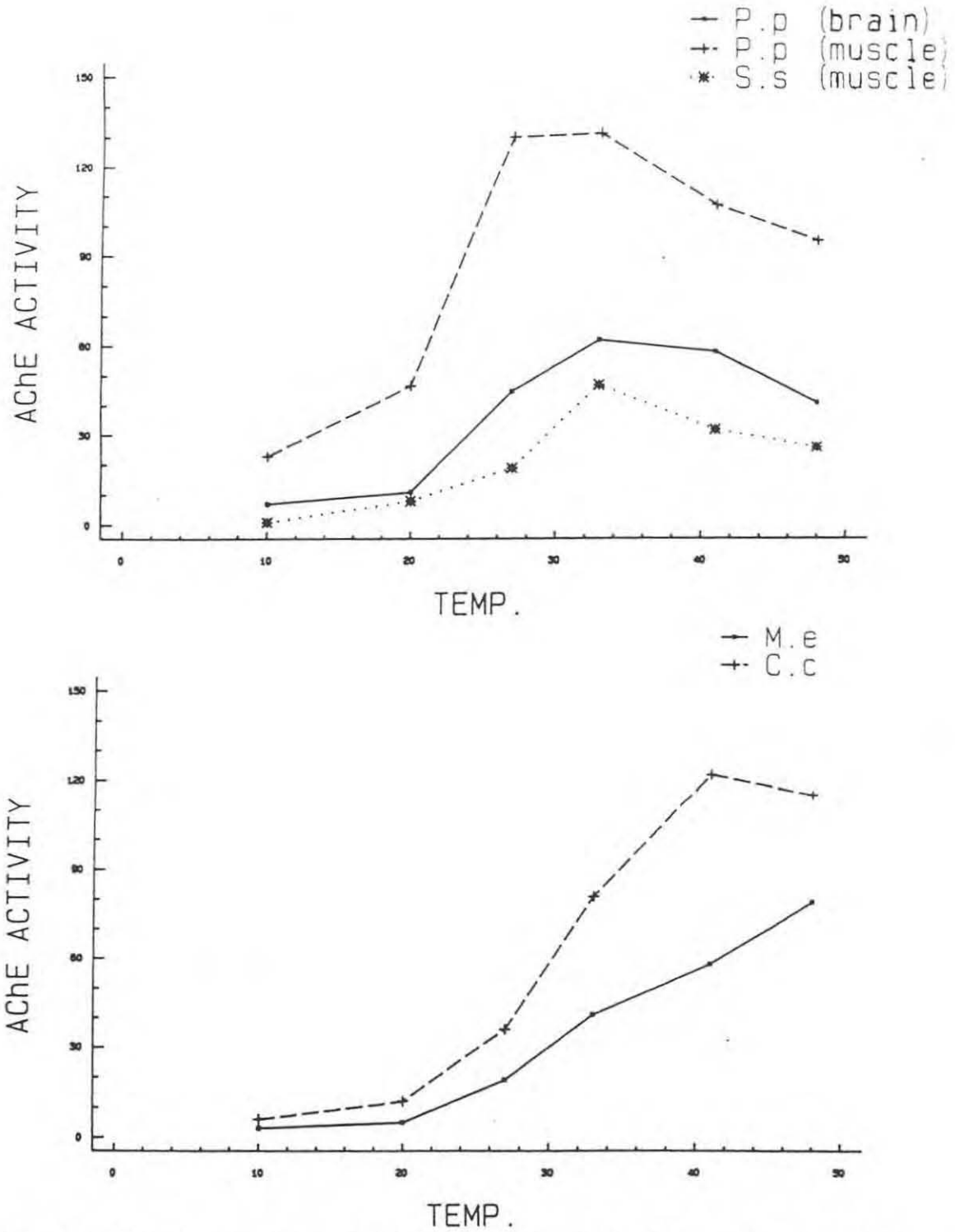


Fig. 4. Effect of temperature on AChE activity in extracts from different marine species (P.p. *Pleuronectes platessa*—S.s. *Scomber scomber* C.c. *Crangon crangon*—M.e. *Mytilus edulis*).

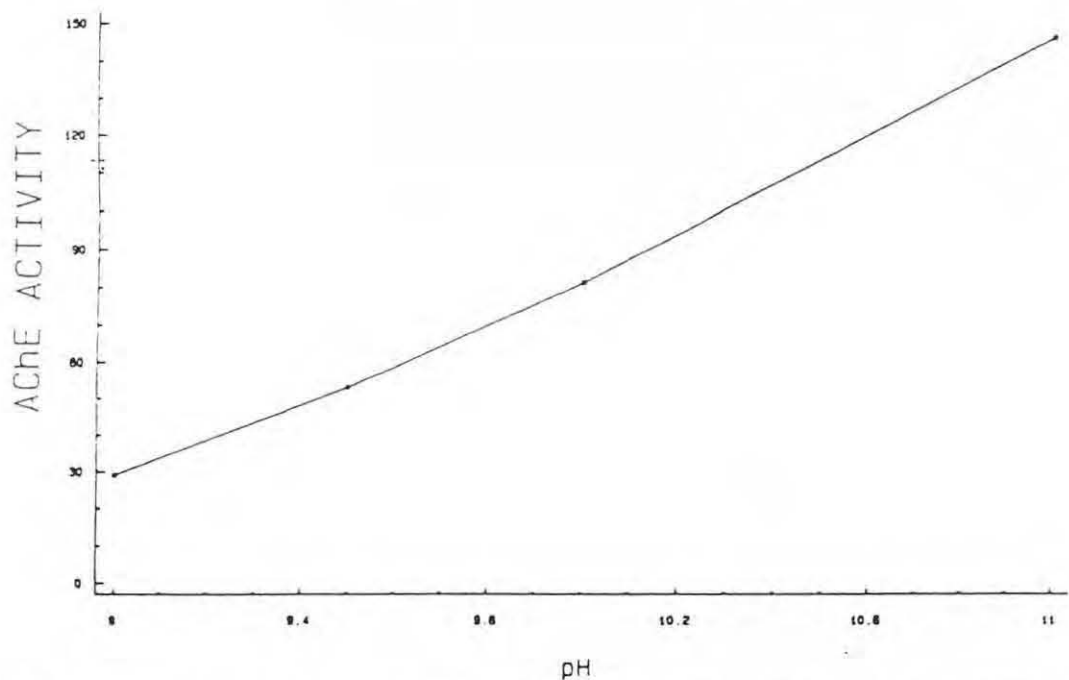
Use of AChE activity in pollution monitoring of marine species

Fig. 5. Spontaneous hydrolysis of acetylthiocholine substrate, 3 mM final concentration. Effect of different pH.

fish extracts. Invertebrate extracts for the common prawn showed an even wider range of 20–42°C, and the common mussel had increased AChE activity, even at 48°C. Fish AChE activity decreased rapidly at temperatures above 34°C.

Determination of optimal pH

Optimal pH was determined for four different buffers (acetate, phosphate, TRIS and borate) at levels ranging between 6.5 and 9. Nonenzymatic hydrolysis of acetylthiocholine substrate was determined, and the values obtained were subtracted from those for pH 9 (Fig. 5). The determination curves (Fig. 6) show a broad plateau with maximal activity between pH 6.5 and 8.5 and decreasing values above 8.5.

Effect of mineral ions

The activity of dialyzed extracts from four marine species was measured in the presence of mineral ions (Table 4). No important differences were noted among the four species. Total inhibition was observed with CuSO_4 10^{-3}M and CuCl $5 \cdot 10^{-5}\text{M}$, and Zn 10^{-3}M and As 10^{-3}M appeared to have a very strong inhibitory effect. Similarly, CdCl_2 10^{-3}M induced a loss of more than half of the activity. AChE from these species would thus appear to be very

Gilles Bocquené et al

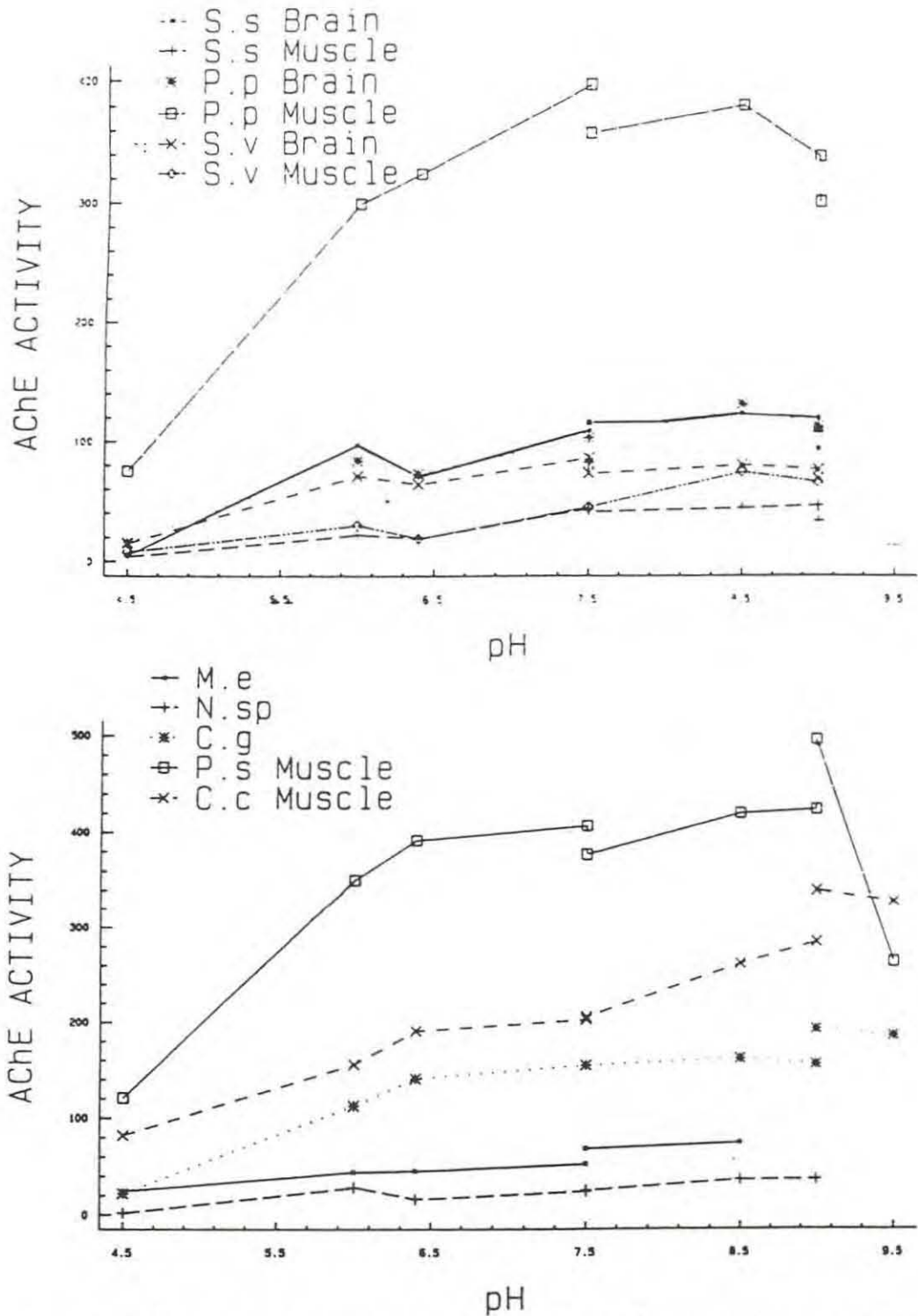


Fig. 6. Effect of pH on AChE activity in extracts from different marine species. Using Acetate buffer (pH4.5/6), phosphate buffer (pH6/7.5), TRIS buffer (pH7.5/9) and borate buffer (pH9/9.5). (S.s. *Scomber scomber*—P.p. *Pleuronectes platessa*—S.v. *Solea vulgaris*—M.e. *Mytilus edulis*—N. sp. *Nereis* sp.—C.g. *Crassostrea gigas*—P.s. *Palaemon serratus*—C.c. *Crangon crangon*).

Use of AChE activity in pollution monitoring of marine species

TABLE 4
Effect of Various Metallic Ions on AChE Activity from Marine Species
(Results are given in percentage of initial activity)

	Cu									
	CuSO ₄				CuCl ₂		Zn		CdCl ₂	As
	(10 ⁻³)	(10 ⁻⁴)	(10 ⁻⁵)	(10 ⁻⁶)	(10 ⁻⁴ × 0.53)	(10 ⁻³)	(10 ⁻⁴)	(10 ⁻³)		
<i>Scomber</i>										
<i>scomber</i>	0	5.6	92.5	96	0	42.6	83.6	89	67	
<i>Pleuronectes</i>										
<i>platessa</i>	0	1.7	92.8	92.3	0	30	79	88	69	
<i>Palaemon</i>										
<i>serratus</i>	0	8.1	87.2	94.6	0	41.7	85	89	73	
<i>Mytilus</i>										
<i>serratus</i>	0	23.6	90.5	100	0	14.7	87	83	68.5	

sensitive to many metallic ions (Von Wachtendonk & Neef, 1979; Olson & Christensen, 1980).

DISCUSSION

The use of biochemical change as an indicator of pollution has many advantages over chemical analysis, which can be difficult to perform and interpret. Moreover, among biological effects of pollutants, biochemical changes occur more quickly than physiological response, thus providing earlier warning of a potential pollution effect.

The relation between AChE inhibition and pesticide contamination levels has been demonstrated many times, and the method of assessing such inhibition is well known. Nonetheless, the use of AChE activity as a monitoring tool for marine pollution by organophosphorus or carbamate insecticides requires good knowledge of the enzyme activity of several marine species. The purpose of this study was to determine the feasibility of using AChE activity to investigate marine pollution by pesticides along the French coast. AChE concentrations were determined in various tissues from several marine species and optimal conditions for measuring AChE activity were studied. It appears that optimal temperature occurs within a wide range from 20 to 34°C. The pH is optimal between 6.5 and 8.5. TRIS extract buffer 0.1M, pH 8, provides good specific production. It is practical to determine enzymatic activity with a microplate reader, which offers many advantages over a classical photometer: rapidity of assays, multiple measurements, reproducibility and the possibility of automation. Moreover, no special preparation of enzyme solution is required.

Gilles Bocquené et al

AChE activity was present in every species at different levels. Plaice muscle showed the highest activity among the vertebrate species studied, and the common prawn among invertebrate species. Activities for the common mussel, oyster and polychaete were too low to prove of interest.

Experts often differ in their opinions about the choice of biological material, and few species have been found to offer a potential for monitoring of biochemical parameters. However, as marine sediments are recognized as a suitable environment for chemical contaminants, several authors have selected benthic or demersal species for monitoring investigations (Bayne *et al.*, 1985; Giam & Ray, 1987).

Most works have been carried out in well-defined areas, especially with respect to freshwater pollution (Weiss & Gakstatter, 1964; Coppage & Matthews, 1974; Verma *et al.*, 1979). Few studies (Lundin, 1967, 1968) have been carried out that could be used for monitoring species along the French coast. However, plaice and the common prawn belong to well-known species with wide distribution, allowing geographical comparisons of pollutant levels. Moreover, these two organisms are very common in coastal and estuarine areas where higher levels of pollutants are found and closer monitoring is required. Chemical analysis may indicate that it is absolutely essential to localize sensitive areas corresponding to specific points of pesticide discharge where a monitoring programme could be developed. Finally, further knowledge is required concerning the normal variability of AChE activity (e.g. as a result of seasonal effects and the influence of animal weight, size and reproductive behavior) in order to facilitate interpretation.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful to Mrs Uhr and Miss Janvier for their secretarial assistance.

REFERENCES

- Bayne, B. L. *et al.* (1985). *The effects of stress and pollution on marine animals*. Praeger Scientific, New York.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive assay of protein utilizing the principle of dye binding. *Analyt. Biochem.*, **772**, 248-64.
- Coppage, D. L. & Matthews, E. (1974). Short-term effects of organophosphate pesticides on cholinesterases of estuarine fishes and pink shrimp. *Bull. Environ. Contam. and Toxicol.*, **II**, No. 5, 438-88.
- Ellman, G. L., Courtney, K. O., Andres, V. & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, **7**, 88-95.
- Finlayson, B. J. & Rudnicki, R. A. (1985). Storage and handling as a source of error

- in measuring fish acetylcholinesterase activity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **35**, 790-95.
- Galgani, F. (1987). Evaluation des méthodes biochimiques applicables à la surveillance biologique de l'environnement marin. IFREMER DERO 87-17 MR. 47 pp.
- Galgani, F. & Bocquene, G. (1988). A method for routine detection of organophosphates and carbamates in sea water. *Environ. Technol. Letters*, **10**, 311-22.
- Galgani, F. & Bocquene, G. (1989). Utilisation des lecteurs de microplaques pour des mesures colorimétriques et enzymatiques. OCEANIS (in press).
- Giam, C. S. & Ray, L. E. (1987). *Pollutant studies in marine animals*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Holmes, R. S. & Whitt, G. S. (1970). Developmental genetics of the esterase isozymes of *Fundulus heteroclitus*. *Biochem. Genetics*, **4**, 471-80.
- Holland, H. T., Coppage, D. L. & Butler, P. A. (1967). Use of fish brain acetylcholinesterase to monitor pollution by organophosphorous pesticides. *Bull. Environ. Contam. and Toxicol.*, **2**, No. 3, 156-62.
- Ices. Coopération research report No. 75. On the feasibility of effects monitoring. ICES, January 1978 Charlottenhund, Denmark.
- Lee, M. & Serat, W. F. (1977). A simple method for cholinesterase determination using an expanded scale pH meter. *Bull. of Environ. Contam. and Toxicol.*, **38**, 29-35.
- Lundin, S. J. (1967). Purification of a cholinesterase from the body muscle of plaice (*Pleuronectes platessa*). *Acta Chem. Scand.*, **22**, No. 7, 2663-8.
- Lundin, S. J. (1968). Properties of a cholinesterase from the body muscle of plaice (*Pleuronectes platessa*). *Acta Chem. Scand.*, **22**, No. 7, 2183-90.
- Olson, D. L. & Christensen, G. M. (1980). Effects of water pollutants and other chemicals on fish acetylcholinesterase inhibition. *Bull. Environ. Contam. and Toxicol.*, **21**, 502-6.
- Silk, E., King, J. & Whittaker, M. (1979). Assay of cholinesterase in clinical chemistry. *Annals Clinical Biochem.*, **16**, 57-75.
- Unesco, A report on the IOC/GEOP workshop on the biological effects of pollutants. held at the University of Oslo, Norway, August 1986.
- Verma, S. R., Tyagi, A. K., Bhatnagar, M. C. & Dalela, R. C. (1979). Organophosphate poisoning to some fresh water teleosts Acetylcholinesterase inhibition. *Bull. Environ. Contam. and Toxicol.*, **21**, 502-6.
- Von Wachtendonk, D. & Neef, J. (1979). Isolation, purification and molecular properties of an acetylcholinesterase (E.C. 3.1.1.7.) from the haemolymph on the sea mussel (*Mytilus edulis*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **3C**, 279-86.
- Wang, C. & Murphy, S. D. (1982). Kinetic Analysis of species difference in Acetylcholinesterase Sensitivity to organophosphate insecticides, *Toxicol. and Applied Pharmacol.*, **66**, 409-19.
- Weiss, C. M. & Gakstatter, J. H. (1964). Detection of pesticides in water by biochemical assay. *Journal WPCF*, **36**, No. 2, 240-52.
- Winners, W., Neef, J. & Von Wachtendonk, D. (1977). Distribution of cholinesters and cholinesterases in haemolymph and smooth muscles of molluscs, *Comp. Biochem. Physiol.*, **1C**, 121-31.
- Zinkl, J. G., Shea, P. J., Nakamoto, R. J. & Callman, J. (1987). Brain cholinesterase activity of rainbow trout poisoned by carbaryl, *Bull. Environ. Contam. and Toxicol.*, **38**, 29-35.

1-4. Polymorphisme moléculaire de l'acétylcholinestérase chez les invertébrés : les différentes formes d'acétylcholinestérase chez l'huître.

On s'intéressera dans ce chapitre aux cholinestérases d'invertébrés marins et principalement au polymorphisme des cholinestérases d'huître. Il est indispensable d'aborder auparavant les travaux récents sur les cholinestérases d'insectes car ils sont un modèle de compréhension préalable aux travaux sur le polymorphisme de l'AChE chez l'huître.

C'est probablement chez les insectes que l'acétylcholinestérase a fait l'objet du plus grand nombre de travaux et ceci pour plusieurs raisons :

- certains diptères montrent une activité AChE aussi élevée que celle mesurée dans les organes électriques de poissons procurant ainsi une source intéressante d'enzyme pour les études de cinétiques notamment ;
- ce sont les cibles principales des traitements par organophosphorés et carbamates et ils montrent une très forte sensibilité à ces produits, supérieure souvent à celle des mammifères ;
- la connaissance de la séquence en acides aminés de l'AChE, déduite de la séquence de l'ADN qui la code permet d'appréhender les facteurs moléculaires responsables de l'hydrolyse des substrats par cette enzyme. De plus, ces connaissances chez les invertébrés ont permis de comprendre comment cette enzyme pouvait être un facteur essentiel de résistance des invertébrés aux insecticides.

L'acétylcholinestérase est la seule cholinestérase des insectes si on se réfère aux critères de sensibilité à 10^{-5} M d'ésérine (carbamate) et à l'inhibition par excès de substrat (Fournier *et al.*, 1988b; Toutant, 1989) bien que Gagnoux Palacios (1995) montre plus récemment que le comportement cinétique de cette cholinestérase est intermédiaire entre celui de l'AChE et de la BuChE de vertébrés. La comparaison de constantes d'inhibition K_i (la K_i reflète l'affinité de l'inhibiteur pour l'enzyme) entre AChE de drosophile et AChE de sérum bovin confirme la plus grande sensibilité des insectes comparée aux mammifères. Ainsi la K_i de l'AChE de drosophile vis à vis du carbaryl (C) est de $2.3 \cdot 10^5$ /M/mn tandis que la K_i de l'AChE de sérum bovin à l'égard du même inhibiteur est de $3.8 \cdot 10^3$ /M/mn, soit un facteur 60 entre les deux sensibilités.

On aborde ici un domaine où les informations sont rares ou parfois trop anciennes pour être utilisables aujourd'hui; l'approche du polymorphisme enzymatique notamment a rapidement évolué ces dernières années où la biologie moléculaire a permis une formidable compréhension des gènes et de leurs produits. L'intérêt

porté actuellement aux biomarqueurs et particulièrement à l'acétylcholinestérase comme indicateur des effets des insecticides a contraint les chercheurs à s'intéresser à des espèces adaptées à la surveillance du milieu marin. Les coquillages, spécialement les bivalves, font l'objet d'attentions particulières pour ce qui concerne la surveillance du milieu marin. La moule (*Mytilus edulis*) et l'huître (*Crassostrea gigas*) sont déjà intégrées dans le réseau de surveillance français (RNO) qui assure le suivi des polluants dans la matière vivante. Chez les bivalves comme chez de nombreux autres organismes, l'acétylcholinestérase présente un important polymorphisme sur le plan moléculaire avec d'intéressantes répercussions sur le plan cinétique. Ces coquillages montrent des activités spécifiques relativement faibles si on les compare aux activités de muscle de crustacés ou à celles de muscle ou cerveau de poissons qui sont très élevées. Chez l'huître et la moule les activités les plus fortes sont mesurées dans le muscle adducteur et la branchie (Bocquené *et al.*, 1990). De plus la sensibilité de ces organismes aux inhibiteurs est médiocre et leur utilisation comme bioindicateurs est délicate (Galvani et Bocquené, 1990). En contrepartie ces organismes sont faciles à collecter, présents sur l'ensemble de la frange littorale et disponibles par le biais de réseaux déjà existants tels que le RNO ou son équivalent américain le Mussel Watch. L'étude qui suit va permettre d'augmenter notablement la sensibilité de "l'outil" acétylcholinestérase.

Les travaux qui sont décrits ici sont consacrés à la purification, la séparation et la caractérisation cinétique des deux formes de cholinestérases qui coexistent chez l'huître commune.

1-4-1. Matériels et méthodes

1-4-1-1. Animaux

Les huitres vivantes proviennent directement de chez un ostréiculteur de Fromentine (Vendée). Les animaux sont congelés vivants pendant 24 heures à -20 C afin de faciliter le prélèvement des différents tissus et notamment des branchies. Des études préliminaires ont montré que les activités spécifiques les plus élevées étaient localisées dans les branchies. Vingt kilogrammes d'huître sont nécessaires à l'obtention de 300 g de branchies.

1-4-1-2. Extraction des cholinestérases chez l'huître

L'extraction est réalisée dans du 20 mM TRIS-HCl pH 7 plus 0.1% Triton X 100. Différents organes de l'huître (muscle adducteur, manteau, hépatopancréas, branchies et palpes labiaux) sont homogénéisés pendant une minute dans un

rapport poids/volume 1/1 à l'aide d'un broyeur de type Ultra Turrax™. Les extraits sont ensuite centrifugés à 10 000 g pendant 30 minutes et l'opération est répétée en resuspendant le culot jusqu'à ce qu'aucune activité soit détectée dans le surnageant. L'activité cholinestérasique est mesurée selon la méthode d'Ellman *et al.* (1961). Le dosage de l'activité enzymatique est donné par la mesure du produit de l'hydrolyse de l'acétylthiocholine.

La méthode de Bradford (1976) est utilisée pour la détermination quantitative des protéines en utilisant l'albumine bovine comme standard. Ce dosage est basé sur la coloration bleue développée lors de la fixation du Bleu de Coomassie sur les groupements cationiques des protéines.

Les activités cholinestérasiques sont exprimées en nmoles de substrat hydrolysées par minute et par milligramme de protéine sur la base d'une unité de densité optique correspondant à l'hydrolyse de 75 nM de substrat.

1-4-1-3. Procédure de purification des cholinestérases de branchie

Du sulfate d'ammonium est ajouté aux surnageants poolés de branchies (300 ml) jusqu'à 70% de saturation, soit 400 mg/ml et le mélange est agité pendant 4 heures à 4°C. Le précipité obtenu après centrifugation de l'ensemble à 10 000g pendant 30 minutes est dissous dans du 20 mM TRIS-HCl pH 7 plus 0.1 % Triton X 100. Après dialyse renouvelée pendant une nuit, l'extrait cholinestérasique est directement chargé sur une colonne d'affinité à la procaïnamide. Le gel contenant la procaïnamide est préparé à partir d'un gel de couplage ECH-Sepharose 4 B de chez Pharmacia™ et de l'EEDQ (N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy 1,2 - dihydroquinoline) de chez Sigma™ comme immobilisateur du ligand. Le tampon de chargement de la colonne est du 20 mM TRIS-HCl pH 7 plus 0.1 % Triton X 100 de même que le tampon de rinçage. Après l'essai de plusieurs tampons d'éluion le meilleur décrochage a été obtenu avec du 20 mM TRIS-HCl pH 9.5 plus 0.1 % Triton X 100 contenant 1 M NaCl et 1 mM procaïnamide. Les fractions présentant une forte activité AChE en sortie de colonne sont poolées et conservées à 4°C avant la séparation des différentes formes moléculaires.

1-4-1-4. Séparation des différentes cholinestérases.

Le détergent non ionique Triton X 114 est utilisé pour séparer les formes amphiphiles ou hydrophobes des formes hydrophiles solubles de cholinestérase. Il est en effet possible de séparer simplement de telles protéines en fonction de la présence ou non d'un système d'ancrage membranaire et en fonction de la nature de cet ancrage. L'affinité des formes amphiphiles pour les détergents non-ioniques leur est conférée par la nature de l'ancrage membranaire de type

hydrophobe. La séparation de phase au Triton X 114 a été développée par Bordier (1981) et repose sur les propriétés du Triton X 114 d'être homogène en solution à 0°C mais de se séparer de la phase aqueuse aux alentours de 30°C. Le suivi de la partition des protéines dans chacune des phases après la séparation à 30°C montre que les protéines hydrophiles donc solubles sont exclusivement récupérées dans la phase aqueuse tandis que les protéines membranaires de nature amphiphile se retrouvent dans la phase détergente.

Le Triton X 114 précondensé à 12 % est préparé comme décrit par Bordier. Les cholinestérases purifiées sont ajoutées à la solution de détergent et placées à 0°C dans de la glace pendant 15 minutes jusqu'à ce que la solution soit parfaitement limpide. La séparation de phase est ensuite initiée par le transfert de la solution à 30°C pendant 15 minutes. Le point de trouble du Triton X 114 se situant aux alentours de 20°C la solution se sépare en deux phases distinctes: la phase supérieure aqueuse contenant les cholinestérases solubles et la phase inférieure détergente retenant les formes membranaires. Après centrifugation rapide chacune des phases est l'objet de deux nouvelles séparations.

Les différentes phases Triton X 114 sont poolées et chargées sur colonne d'affinité à la procaïnamide pour une ultime purification. Les phases aqueuses solubles sont traitées de la même manière. Des aliquots de chacune des formes sont chargées sur un gel d'électrophorèse en gradient d'acrylamide dans des conditions non dénaturantes.

1-4-1-5. Migration en électrophorèse non-dénaturante des formes séparées

Les électrophorèses sont réalisées en conditions non-dénaturantes dans un gel gradient de polyacrylamide 2-23 % contenant 0.25 % de déoxycholate de sodium. Quand ce tensio-actif chargé négativement est présent dans le gel, il se fixe à la forme hydrophobe et permet sa migration vers l'anode tandis que la migration de la forme soluble n'est pas altérée (Arpagaus et Toutant, 1985). Le tampon de migration est du 0.1 M TRIS, 0.1 M Borate, 2mM EDTA pH 8.9 contenant 0.25% de déoxycholate. Les bandes de cholinestérases sont révélées par la coloration de Karnovsky et Roots (1964). Le principe de cette coloration repose sur la réduction du ferricyanure de potassium en ferrocyanure par la thiocholine après hydrolyse de l'acétylthiocholine. Le ferrocyanure se combinant avec les ions cuivriques pour former un ferrocyanure de cuivre insoluble qui précipite en spots brun/orange sur les bandes de cholinestérases. Les poids moléculaires des différentes formes sont estimés par comparaison avec la migration de protéines de haut poids moléculaire pour électrophorèse non-dénaturante (kit Pharmacia).

1-4-1-6. Traitement PI-PLC de la forme amphiphile

La détermination de la nature de l'ancrage de la forme amphiphile se fait par digestion par une phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) extraite de *Bacillus cereus* (Sigma). La digestion est effectuée à 37° C pendant une heure. La conversion de la forme amphiphile en une AChE soluble par clivage de l'ancrage hydrophobe par la phospholipase C (5U/ml) est suivie et contrôlée par la distribution en partition de phase dans du Triton X 114 précondensé et par migration en gel non-dénaturant en présence de Triton X 100 0.1%.

1-4-1-7. Spécificité des formes AChE vis à vis de différents substrats et inhibiteurs

L'hydrolyse de trois substrats différents, l'acétylthiocholine (AcSCh), la butyrylthiocholine (BuSCh) et la propionylthiocholine (PrSCh) est mesurée pour chaque forme moléculaire pour des concentrations croissantes en substrat de 5 μ M à 10 mM à 25° C. La constante de Michaelis, K_m , est déterminée par analyse de la transformation de Lineweaver-Burk. La sensibilité de chacune des formes à l'inhibition par trois organophosphates, le DNP (paraoxon), le DFP (diisopropylfluorophosphate), l'iso-OMPA (tétraisopropyl pyrophosphoramidate) un inhibiteur spécifique de la butyrylcholinestérase humaine et trois carbamates, l'éserine, le carbaryl et le carbofuran est étudiée. Les solutions mères d'inhibiteur sont préparées dans de l'éthanol. La constante de réaction bimoléculaire, k_i , qui exprime le pouvoir inhibiteur, est calculée en linéarisant l'activité enzymatique résiduelle ($\ln A/A_0$) en fonction du temps d'incubation avec l'inhibiteur. Dans ces conditions de calcul, k_i est donné par l'équation $a = -k_i [I]$, $[I]$ étant la concentration en inhibiteur.

1-4-1-8. Distribution des différentes formes de cholinestérases dans les tissus de l'huître

La sensibilité particulière d'une des deux formes a permis une investigation de la distribution naturelle des formes de l'AChE dans les principaux tissus de l'huître

1-4-2. Résultats

1-4-2-1. Extraction, purification et séparation.

La quantité globale d'activité AChE extraite par le tampon 0.02 M TRIS pH 7 0.1 % Triton X100 est donnée pour différents tissus de l'huître par le tableau 4. Les activités spécifiques montrent que les branchies, le manteau et l'hépatopancréas

présentent les plus fortes activités chez l'huître tandis que les activités mesurées dans les deux fractions du muscle adducteur (muscle lisse et muscle strié) sont étonnamment faibles bien que l'innervation de ces muscles est de type cholinergique (Wilbur, 1983). Il faut préciser que la présence dans cet organe de fortes concentrations de groupements thiols susceptibles d'interférer avec le réactif d'Ellman a nécessité une étape de pré-dialyse sur un tube à dialyse d'un niveau d'arrêt à 100 kDA avant que l'activité ne soit efficacement mesurée.

	Branchies	Hépatopancréas	Manteau	Palpes labiaux	Muscle adducteur strié	Muscle adducteur lisse
Activité spécifique AChE	28.2 (6.4)	25.5 (9.0)	24.3 (5.8)	13.0 (8.6)	6.9 (9.9)	6.2 (8.5)

Tableau 4 : Activités spécifiques AChE dans les principaux tissus de l'huître commune. Les activités sont exprimées en nM d'AcSCh hydrolysée/min/mg protéine). Les concentrations en protéines (en mg/ml d'extrait brut) sont données entre parenthèses.

Le rendement de la purification des cholinestérases sur colonne d'affinité à la procaïnamide se situe entre 23 à 57 % de l'activité totale chargée. Ce rendement peut être considéré comme relativement faible si on le compare avec la purification des cholinestérases d'un autre bivalve, la coquille St Jacques *Pecten maximus* où le rendement atteint 80% de l'activité fixée (Bocquené, non publié). Ceci suggère probablement une médiocre affinité des formes ChE de l'huître vis à vis de ce ligand. Des essais de fixation sur colonne d'affinité sur concanavalin A-Sepharose (ConA-Séparose) comme première étape de purification ont montré qu'une des deux formes ne se fixait pas sur ce type de colonne. Après incubation de la forme non fixée avec du DFP cette forme s'est avérée être la forme amphiphile ancrée tandis que la forme adsorbée sur ConA Séparose était la forme soluble. La séparation des deux formes dans la solution au Triton X 114 est suivie par la mesure de l'activité enzymatique dans chacune des deux phases en présence de paraoxon 10^{-3} M. Ce contrôle montre que le rendement de séparation au Triton X 114 conduit à une purification à 100% de la forme amphiphile inhibée à 100% par le paraoxon 10^{-3} M et à 95-98% de récupération de la forme soluble qui ne présente que 2 à 5% d'inhibition au paraoxon. Les 2-5% d'activité inhibée qui ne sont pas passés dans la phase détergente TX 114 sont

probablement dus à des formes nativement ancrées mais rendues solubles par protéolyse naturelle de l'ancrage hydrophobe.

1-4-2-2. Migration des formes séparées en électrophorèse non dénaturante

La figure 9 confirme que les cholinestérases natives purifiées à partir de la branchie d'huître existent sous deux formes moléculaires distinctes .

Quand un détergent anionique est incorporé dans le gel, les formes amphiphile de l'AChE peuvent migrer jusqu'à ce qu'elles atteignent la zone de gradient correspondant à leur poids moléculaire apparent (Fournier *et al.*, 1987). Ce type de gel gradient en présence de détergent anionique permet donc l'estimation du poids moléculaire apparent de chacune des formes qui est estimé à 200 kDa pour la forme amphiphile et à 300 kDa pour la forme soluble. Une seconde bande apparaît tardivement dans le couloir de migration de la forme soluble. Cette forme dont la migration dans le gel est stoppée à la même hauteur que la forme amphiphile dérive probablement de la digestion partielle de l'ancrage glycolipidique par des enzymes endogènes car malgré les séparations répétées au Triton X 114. Cette bande est toujours présente sur les gels de manière plus ou moins marquée.

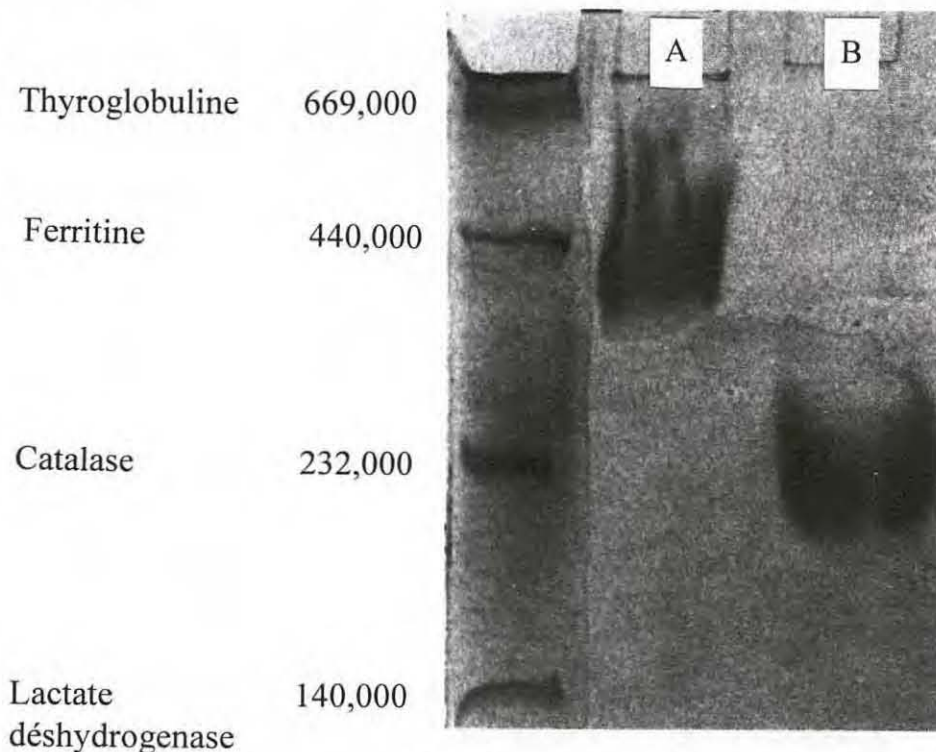


Figure 9 : Migration électrophorétique des cholinestérases de l'huître.

L'électrophorèse non dénaturante est réalisée dans un gel gradient de polyacrylamide en présence de 0.25% de déoxycholate. Puits A : migration de la fraction AChE soluble insensible. Puits B : migration de la fraction amphiphile sensible.

En fait cette forme correspond aux 2%-5% d'activité sensible au paraoxon qui sont retrouvés dans la phase aqueuse après partition au Triton X 114.

1-4-2-3. Digestion de la forme hydrophobe par la PI-PLC

La conversion de la forme hydrophobe en sa congénère soluble hydrophile par la phosphatidylinositol-specific phospholipase C est suivi par le contrôle de la distribution de l'AChE après partition de phase en présence de Triton X 114. Le tableau 2 montre les activités AChE retrouvées en phase aqueuse en présence et en absence (témoin) de PI-PLC. La présence d'un ancrage phosphatidylinositol sur la forme hydrophobe est démontré par le relargage de 92 % de l'activité AChE totale dans le surnageant produit de la digestion par la PI-PLC (tableau 5). De la même manière, la libération de la fraction soluble après digestion à partir de la forme hydrophobe après une heure d'incubation avec la PI-PLC peut être contrôlée sur gel gradient de polyacrylamide en conditions non dénaturantes et en présence de 0.1% Triton X 100 (fig.10). La migration d'une fraction de la forme AChE objet de la partition de phase après incubation avec la PI-PLC est comparée à la migration d'une aliquote de la forme hydrophobe non traitée à la PI-PLC. En présence du détergent non-ionique Triton X 100, la migration de la fraction hydrophobe non traitée est stoppée dans le gel à une hauteur qui ne correspond pas à son poids moléculaire mais qui est essentiellement fonction de la nature du détergent tandis que la migration de la forme digérée devenue hydrophile n'est pas perturbée. Une telle comparaison n'aurait pu être réalisée dans le gel utilisé précédemment et qui contenait un détergent anionique puisque celui ci se fixe à l'AChE hydrophobe et migre dans le gel.

	Témoin	Traitement PI-PLC
AChE dans le surnageant aqueux	2.25	27.8
AChE dans la phase Triton TX 114	25.5	2.25
% de formes solubles	8.8	91.9

Tableau 5 : Effet de la digestion à la PI-PLC sur la partition en phase Triton XII4 de la forme AChE membranaire chez l'huître.

L'activité AChE est exprimée en nM d'AcSCh hydrolysée/ mn /100 µl.

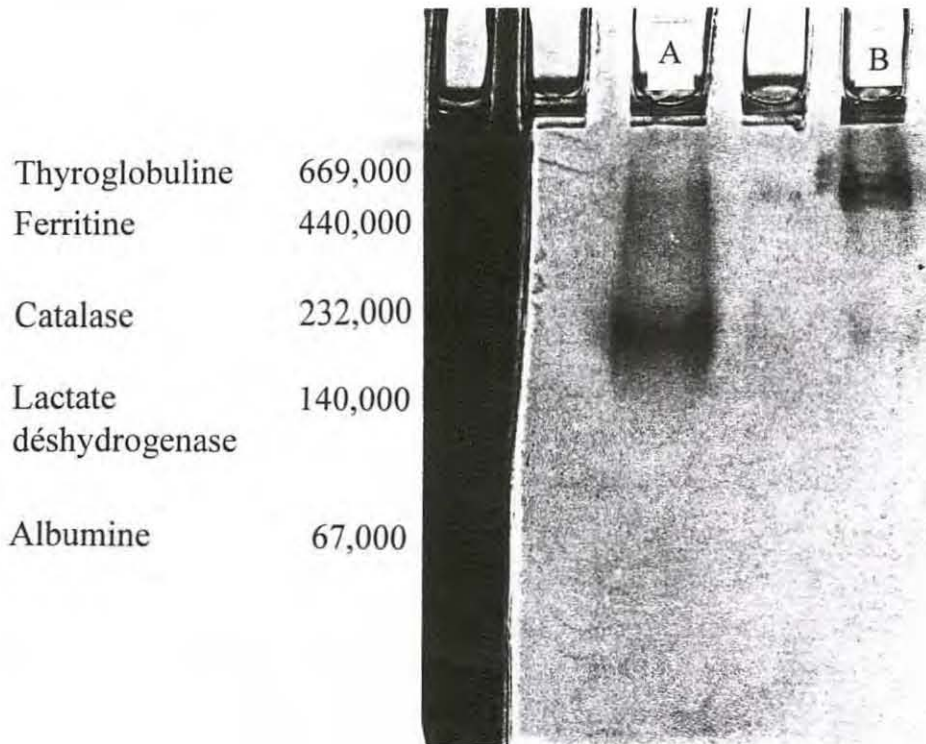


Figure 10 : Conversion de la fraction AChE membranaire en AChE soluble par traitement à la PI-PLC.

L'électrophorèse est réalisée en conditions non-dénaturantes, sur un gel gradient de polyacrylamide en présence de 0.1% Triton X100.

Puits A : migration de la fraction membranaire traitée à la PI-PLC.

Puits B : migration de la fraction membranaire non traitée.

Les deux méthodes, mesure de la répartition de l'activité AChE après partition de phase et gel en conditions non dénaturantes et en présence de détergent non-ionique aboutissent aux mêmes conclusions et suggèrent que le comportement hydrophobe de cette fraction AChE est du à la présence d'un ancrage glycophospholipidique et qu'en conséquence la forme hydrophobe de l'acétylcholinestérase de l'huître est une forme ancrée dans la membrane.

1-4-2-4. Spécificité des deux formes vis à vis de différents substrats et inhibiteurs

La spécificité de substrat des deux formes vis-à-vis de l'acétylthiocholine iodide, la butyrylthiocholine iodide et la propionylthiocholine iodide est mesurée à une concentration finale en substrat de 5 μ M à 1 mM. Les résultats sont regroupés dans le tableau 6. La constante de Michaelis qui reflète l'affinité de l'enzyme pour un substrat donné est déterminée par analyse de la transformation linéaire de Lineweaver-Burk à partir de l'équation de Michaelis, $1/v$ étant fonction de $1/s$.

AChE membranaire	Km (M)	Kss (mM)
AcSCh	$7.76 \cdot 10^{-5}$	13.3
BuSCh	$6.35 \cdot 10^{-5}$	-
PrSCh	$1.24 \cdot 10^{-4}$	-
AChE Soluble	Km (M)	Kss (mM)
AcSCh	$1.8 \cdot 10^{-5}$	15.13
BuSCh	*	-
PrSCh	$3.9 \cdot 10^{-5}$	-

Tableau 6 : Caractéristiques cinétiques des deux formes d'acétylcholinestérase de l'huître vis-à-vis de trois substrats .

La forme hydrophobe est plus active envers l'AcSCh (100 %) avec une activité moins forte contre la PrSCh (81 %) et une très faible activité vis-à-vis de la BuSCh (8.5 %). La forme soluble présente des activités presque semblables pour l'AcSCh et la PrSCh avec respectivement 100 % et 93 % mais n'a aucun effet sur la BuSCh (fig.11).

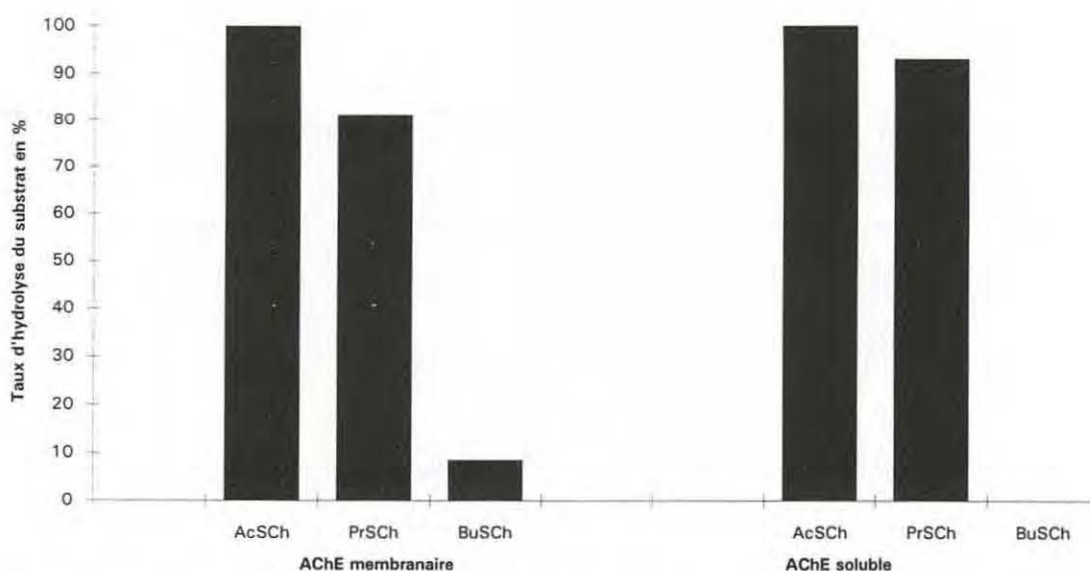


Figure 11 : Hydrolyse des substrats AcSCh, PrSCh et BuSCh par les deux formes de cholinestérase de la branchie d'huître. La concentration finale en substrat est 10^{-3} M. L'hydrolyse est mesurée sur 1 mn.

AcSCh : acétylthiocholine. PrSCh : propionylthiocholine. BuSCh : butyrylthiocholine.

Les deux cholinestérases montrent un comportement Michaelien type dans la gamme de concentrations en substrat de 5 μM à 1 mM avec l'acétylthiocholine comme substrat (fig. 12 et 13). Les K_m s sont du même ordre de grandeur, 78 μM pour la forme ancrée hydrophobe et 18 μM pour la forme soluble.

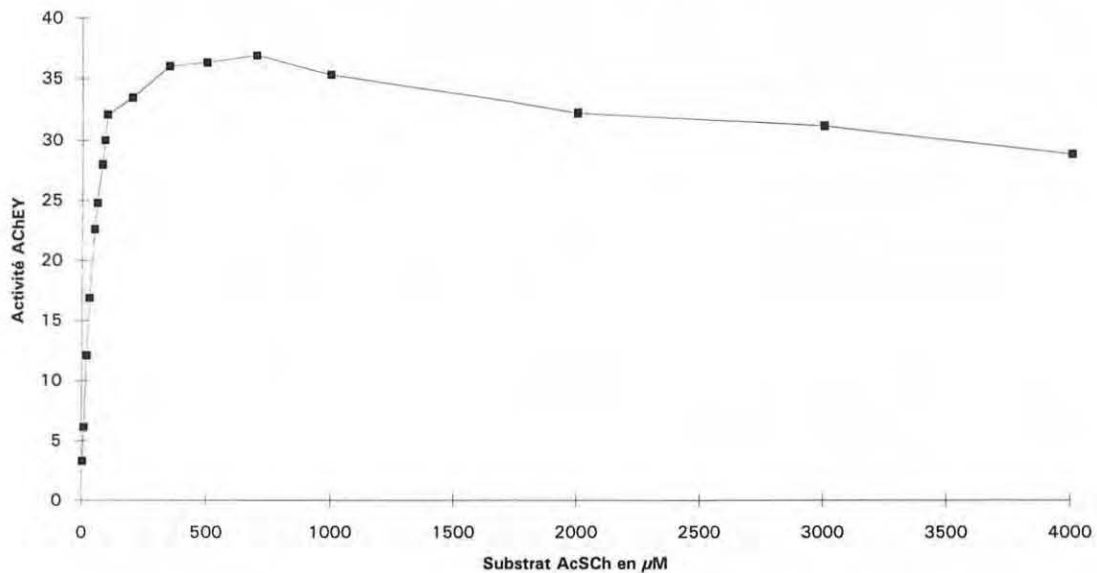


Figure 12: Cinétique partielle de $v = f([s])$ de la forme membranaire de l'acétylcholinestérase de branchie d'huître vis-à-vis de l'acétylthiocholine.

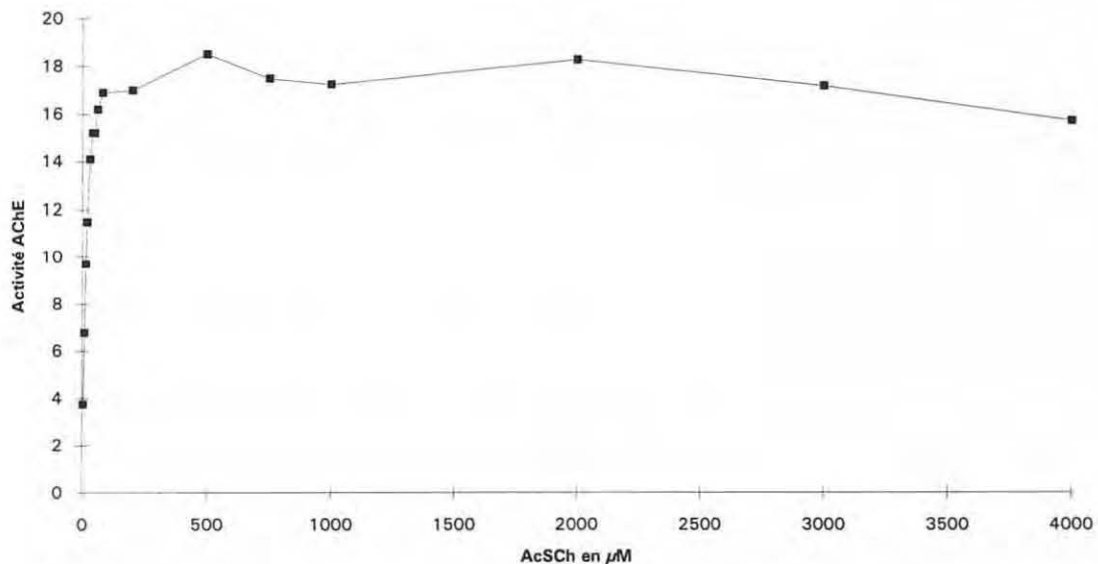


Figure 13: Cinétique partielle de $v = f([s])$ de la forme soluble de l'acétylcholinestérase de branchie d'huître vis-à-vis de l'acétylthiocholine.

La K_m de la forme membranaire vis-à-vis de la BuSCh est sensiblement la même que pour l'AcSCh (63 μM) bien que l'hydrolyse de ce substrat soit faible. Les

deux formes AChE présentent une inhibition par excès de substrat à des concentrations autour de 5 mM qui permet le calcul de la K_{ss} évaluée à 13.3 mM pour la forme hydrophobe et 15.1 mM pour la forme soluble.

Les expériences d'inhibition avec les organophosphorés et les carbamates mettent en relief la très forte différence dans la sensibilité des deux formes moléculaires. Si l'on exclut le cas du carbamate éserine, la forme soluble se révèle extrêmement insensible tandis que la forme membranaire est très sensible. Les résultats exprimés dans le tableau 7 montrent que la forme hydrophobe est 40 000 fois plus sensible aux effets du DNP (paraoxon) et 16 000 fois plus sensible au carbofuran que la forme soluble qui ne semble sensible qu'à l'éserine.

L'insensibilité de la forme soluble est telle que le calcul du k_i du carbofuran pour cette forme atteint $135 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

	AChE membranaire	AChE soluble
DFP	$2.0 \cdot 10^3$	1.3
DNP	$3.0 \cdot 10^5$	7.6
Iso-OMPA	3.0	*
Esérine	$4.7 \cdot 10^5$	$2.7 \cdot 10^4$
Carbofuran	$2.2 \cdot 10^6$	135
Carbaryl	$6.7 \cdot 10^4$	62.5

Tableau 7 : Constantes d'inhibition (k_i en $\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) de six inhibiteurs sur les deux formes de l'AChE d'huître (* = pas d'inhibition à 10^{-3} M iso-OMPA).

1-4-2-5. Distribution des deux formes d'AChE dans les principaux organes de l'huître

L'existence dans les branchies de l'huître de deux formes d'acétylcholinestérase qui diffèrent notamment dans leur sensibilité aux inhibiteurs tels que le paraoxon a été l'opportunité d'étudier la distribution de chacune de ces deux formes dans les autres organes de l'huître. Cette étude a été réalisée après incubation avec du paraoxon 10^{-3} M des surnageants bruts récoltés en fin de phase d'extraction des principaux organes de l'huître. Les résultats de cette recherche sont regroupés dans le tableau 8 et montrent des différences importantes entre les tissus.

Organe	Activité AChE totale	Activité AChE en présence de 10^{-3} M paraoxon	% de forme AChE membranaire	% de forme AChE soluble
Branchies 1	25.2 ± 0.7	4.1 ± 0.3	83.6 %	16.4 %
Branchies 2	63.8 ± 4.3	11.3 ± 4.3	82.4%	17.6 %
Branchies 3	30.8 ± 0.8	17.0 ± 1.7	45 %	55 %
Hépatopancréas	34.2 ± 4.9	9.0 ± 1.2	73.7 %	26.3 %
Manteau	19.6 ± 2.0	16.7 ± 2.7	14.9 %	85.1 %
Palpes labiaux	22.7 ± 2	18.7 ± 1.65	17.5 %	82.5 %
Muscle adducteur strié	39.5 ± 4.1	13.2 ± 3.0	66.6 %	33.4 %
Muscle adducteur lisse	36.1 ± 1.1	15.4 ± 0.3	57.4 %	42.6 %

Tableau 8 : Distribution des deux formes de l'AChE dans les différents tissus de l'huître.

Les activités sont exprimées en nmoles d'AcSCh hydrolysées/100 μ l d'extrait. Les résultats sont donnés en moyenne \pm S.D de 4 déterminations. (Branchies 1 : animaux prélevés en décembre 94. 2 : animaux prélevés en février 95. 3 : animaux prélevés en mai 95.)

Les deux formes coexistent dans tous les organes étudiés mais dans des proportions variables. On doit noter que des séries d'extractions réalisées à partir de branchies d'animaux prélevés à différentes périodes de l'année (en décembre, février et mai) donnent des distributions distinctes des deux formes dans le même organe. Ainsi la répartition des deux cholinestérases est différente entre les animaux prélevés en Mai et ceux prélevés en hiver. Le changement important dans le métabolisme général que subissent ces organismes pendant la période de reproduction (de mai à septembre) peut être une possible explication de cette modification. Il semble que la distribution des cholinestérases ne soit seulement liée à la nature du tissu mais résulte probablement de nombreux critères incluant les paramètres environnementaux qui sont souvent déterminants chez les organismes aquatiques.

1-4-3. Discussion et comparaison avec les cholinestérases d'autres invertébrés

La démonstration est faite de la présence simultanée chez l'huître commune de deux cholinestérases distinctes. Les caractéristiques structurales et catalytiques de ces deux formes suggèrent que ces cholinestérases isolées de la branchie sont deux protéines distinctes probablement produites à partir de gènes différents. Ces travaux montrent que les organes principaux de l'huître expriment ces deux cholinestérases dans des proportions variables.

Chez les annélides, les nématodes et les mollusques, la présence de plusieurs gènes de cholinestérases aboutit à un polymorphisme de ces enzymes large et complexe. Chez les nématodes *Panagrellus redivivus* et *Steinernema carpocapsae*, l'AChE est codée par deux gènes différents (Mulder and Bakker, 1992 ; Arpagaus *et al.*, 1994) et trois gènes différents, *Ace-1*, *Ace-2*, *Ace-3* codent pour trois classes de d'acétylcholinestérase (A, B and C) chez les nématodes *Caenorhabditis elegans*, *Meloidogyne arenaria* et *Meloidogyne incognita* (Chang and Opperman, 1991 ; Arpagaus *et al.*, 1994). L'identification de la classe AChE C est particulièrement intéressante car cette classe, décrite très récemment, est caractérisée par une très forte résistance aux inhibiteurs OP et C très voisine de la résistance de la forme soluble de l'AChE d'huître. Cette insensibilité aux inhibiteurs fait de ces cholinestérases une classe unique parmi les cholinestérases qui étaient caractérisées jusqu'à maintenant par une extrême sensibilité aux organophosphorés et carbamates.

La question qui se pose à ce stade de caractérisation est de savoir si la forme très résistante aux OP et C est une acétylcholinestérase vraie ou une estérase non-spécifique qui hydrolyserait, entre autres substrats, l'acétylcholine. Bien que nous ne sachions pas si ces enzymes sont réellement impliquées dans l'hydrolyse *in vivo* de l'acétylcholine de l'huître, plusieurs éléments suggèrent que les deux formes de cholinestérases d'huître sont bien des acétylcholinestérases :

- les deux formes sont plus actives avec l'acétylthiocholine qu'avec les autres esters de choline testés ;
- l'affinité des deux formes pour l'acétylthiocholine est élevée (K_m situés entre 10 et 100 μM) ;
- les deux formes sont inhibées par un excès de substrat mais insensibles à l'iso-OMPA, inhibiteur spécifique de la butyrylcholinestérase de vertébrés.

Les cholinestérases ont été décrites et classifiées par de nombreux auteurs en deux groupes, acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase en fonction des préférences de substrat et de la sensibilité aux inhibiteurs (voir chapitre 1-1.). Les deux formes purifiées chez l'huître sont plus actives avec l'acétylthiocholine qu'avec la propionylthiocholine, elles ne sont quasiment pas actives avec la butyrylthiocholine. Elles sont toutes deux inhibées par excès d'acétylthiocholine mais ne sont pas sensibles à l'iso-OMPA qui est reconnu comme inhibiteur spécifique des butyrylcholinestérases (Toutant, 1989 ; Sine *et al.*, 1992). Pour ces raisons les cholinestérases d'huître peuvent être considérées comme étant des acétylcholinestérases vraies. Cependant il faut noter que cette classification des cholinestérases n'est clairement établie que chez les vertébrés où deux gènes distincts ont été identifiés et séquencés. La classification des cholinestérases d'invertébrés est plus floue notamment pour ce qui concerne certains comportements cinétiques qui ont été décrits comme intermédiaires entre les acétyl et butyrylcholinestérases. Von Wachtendonk et Neef (1979) décrivent une seule acétylcholinestérase mais quatre butyrylcholinestérases dans l'hémolymphe de la moule (*Mytilus edulis*) qui diffèrent dans leur comportement pharmacologique. Selon Arpagaus *et al.* (1992) seule l'AChE vraie a pu être décrite chez les invertébrés alors que pour Talesa *et al.* (1990) la cholinestérase extraite du gastéropode *Murex brandaris* est une propionylcholinestérase dans la mesure où la PrSCh est un meilleur substrat pour cette enzyme que l'AcSCh ou la BuSCh. Mais, plus récemment, les mêmes auteurs (Talesa *et al.*, 1995) utilisent le terme d'acétylcholinestérase pour décrire les cholinestérases de sangsue (*Hirudo medicinalis*, annélide) bien que le substrat préférentiel de ces cholinestérases soit aussi la propionylthiocholine. En réalité cette confusion est la conséquence du fait que acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase sont des enzymes très proches et que la spécificité de chacune ne tient qu'à quelques modifications du site actif. Ainsi la conversion d'une AChE en cholinestérase ayant un comportement de BuChE a été provoquée par la substitution d'un seul acide aminé dans la gorge active de l'enzyme (Vellom *et al.*, 1993).

Sur le plan cinétique, les deux AChEs membranaire et soluble montrent des affinités pour l'acétylthiocholine de l'ordre de 10^{-5} M (respectivement $7.8 \cdot 10^{-5}$ M and $1.8 \cdot 10^{-5}$ M) . Des valeurs similaires ont été publiées vis-à-vis du même substrat pour la forme sensible au détergent de l'acétylcholinestérase de sangsue ($2.5 \cdot 10^{-5}$ M), pour l'acétylcholinestérase d'un coquillage, le murex ($7.8 \cdot 10^{-5}$ M) et pour les classes A et B des cholinestérases de nombreux nématodes. D'un point de vue affinité pour le substrat acétylthiocholine, les deux cholinestérases décrites

chez l'huître montrent des caractéristiques tout à fait comparables aux autres cholinestérases connues qu'elles soient d'invertébrés ou de vertébrés.

La forme acétylcholinestérase soluble de l'huître est décrite comme étant particulièrement insensible aux inhibiteurs et de ce fait assez semblable aux cholinestérases de la classe C de nombreux nématodes. Des études d'inhibition il résulte que l'utilisation du paraoxon 10^{-3} M, entre autres inhibiteurs, est un moyen simple de discriminer la forme sensible de la forme résistante dans un extrait brut des deux formes. Or on a vu précédemment que la mesure de l'activité AChE chez les mollusques est un faible biomarqueur des effets des contaminants neurotoxiques. Il est tout à fait probable que cette insensibilité apparente est due à la présence de la forme soluble résistante dans l'extrait brut des organismes sentinelles. En effet la coexistence des deux formes masque la sensibilité de la forme ancrée.

Les études des effets *in vitro* des OP et C sur des extraits de divers organismes marins (Galgani et Bocquené, 1990) ont montré la faible sensibilité de l'activité AChE totale des bivalves comparée à celle des crustacés très sensibles aux carbamates et à celle de vertébrés tels que la plie (*Pleuronectes platessa*). Les mêmes travaux réalisés cette fois sur les deux isoformes purifiées de cholinestérase d'huître mettent en évidence la sensibilité de la forme ancrée qui se situe entre la sensibilité des AChEs de vertébré (AChE de sérum bovin) et celles d'insectes (AChE de drosophile) et atteint même la sensibilité de ces dernières vis à vis du carbofuran et du paraoxon.

Le tableau 9 résume les valeurs de constantes d'inhibition obtenues à partir d'AChEs d'origines diverses et souligne l'importance qu'il y a de connaître et décrire le polymorphisme de cette enzyme spécialement chez les espèces susceptibles de présenter un intérêt particulier lors de la mise en place de programmes de surveillance.

Maintenant que les propriétés de chacune des formes sont connues, particulièrement en terme de sensibilité au paraoxon 10^{-3} M, on peut considérer qu'isoler la mesure de l'activité de la fraction membranaire est un progrès sensible dans l'utilisation des cholinestérases de mollusques, d'huître en particulier, comme marqueur des effets des polluants.

Pratiquement l'activité de la forme sensible est calculée par la différence entre l'activité AChE totale d'un extrait brut et l'activité mesurée en présence de paraoxon 10^{-3} M.

Organisme d'origine	Inhibiteur	K_i en $M^{-1} mn^{-1}$
AChE Sérum bovin	Carbaryl	$3.8 \cdot 10^3$
AChE drosophile		$2.3 \cdot 10^5$
AChE soluble-huître		62.5
AChE ancrée-huître		$6.7 \cdot 10^4$
AChE Sérum bovin	Carbofuran	$3.3 \cdot 10^5$
AChE drosophile		$1.6 \cdot 10^6$
AChE soluble-huître		135
AChE ancrée-huître		$2.2 \cdot 10^6$
AChE Sérum bovin	Eserine	$2.8 \cdot 10^5$
AChE drosophile		$5.4 \cdot 10^7$
AChE soluble huître		$2.75 \cdot 10^4$
AChE ancrée-huître		$4.7 \cdot 10^5$
AChE Sérum bovin	Paraoxon	$7.5 \cdot 10^4$
ACh E drosophile		$8.6 \cdot 10^5$
AChE soluble-huître		7.6
AChE ancrée-huître		$3 \cdot 10^5$

Tableau 9: Comparaison entre les constantes d'inhibition des deux formes d'AChE d'huître et les AChEs de diverses origines vis à vis de quatre inhibiteurs.

PUBLICATION 2 :

**The molecular forms of acetylcholinesterase from
the common oyster (*Crassostrea gigas*)**

Soumis pour publication

The molecular forms of acetylcholinesterase from the common oyster
(*Crassostrea gigas*)

Evidence for the presence of a soluble form not sensitive to organophosphate and carbamate
inhibitors.

Gilles BOCQUENÉ (†) and Didier FOURNIER (‡)

†. IFREMER, DEL Ecotoxicologie, BP 1049, 44037 Nantes Cedex, France.

‡. Laboratoire d'Entomologie, Université P. Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062, Toulouse,
France.

Send correspondence to

D. Fournier

Laboratoire d'Entomologie

Université P. Sabatier,

118 route de Narbonne,

31062, Toulouse, France.

Fax : 33 61 55 60 00

e mail : fournier @ cix.cict.fr

The partial purification, separation and characterization of two cholinesterases extracted from the oyster *Crassostrea gigas* are described. They differ in their apparent molecular weight, glycosylation, hydrophobicity and sensitivity to inhibitors, leading to suggest that they are the product of two different genes. The A form is 200 kDa as apparent molecular weight, is anchored to the membrane via a glycolipid, is not glycosylated and is sensitive to organophosphate and carbamate inhibitors. The molecular weight of the B form is 300 kDa, the protein is hydrophilic, glycosylated and highly resistant to organophosphorous and carbamate inhibitors.

The kinetic properties of the two cholinesterases are compared with other invertebrate cholinesterases and improvement in using oyster sensitive cholinesterases as a biomarker of effects of pollutants is discussed.

INTRODUCTION

Cholinesterases are highly polymorphic enzymes in most species. As they play an important role in the transmission of the nervous influx and as they are the specific target of most nerve agents and insecticides, cholinesterases have been extensively studied. Number of genes coding for cholinesterases varies between the species, one in insects, two in vertebrates and three in nematodes. The products of the different genes may be characterized by their catalytic properties. For example, in vertebrate use of acetylcholine and butyrylcholine allowed to separate the two proteins in acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (EC. 3.1.1.8). For each protein, various molecular forms of the protein, originates either from alternative splicing of the gene or from degradation. These form may be soluble, linked to the basal lamina via a collagen tail or to the membrane via a glycolipid or via an hydrophobic peptide. They have been divided as assymetric and globular. Assymetric or collagen-tailed forms exist in all vertebrate classes but seem to be absent in invertebrates. Globular form are encountered as monomers, dimers and tetramers. They may be soluble or linked to the membrane via a glycolipid or via an hydrophobic peptide.

Cholinesterases hydrolyse a large variety of substrate including choline esters and organophosphorous insecticides. The chemical steps consist in a nucleophilic attack of the substrate generating an acyl-enzyme or a phosphoryl-enzyme intermediate and its subsequently deacylation or dephosphorylation. As dephosphorylation is very slow, organophosphorous compounds may be considered as irreversible inhibitors. Individuals who have been intoxicated with these compounds have a part of the cholinesterase inactive. Cholinesterases are present in the synaptic cleft where it catalyzes the hydrlisis of the neurotransmitter, acetylcholine. In this situation, inhibition of the enzyme is lethal. But the enzyme is also present in other regions where its inhibition does not affect viability (Massoulié et al., 1993).

Insecticides are widely used to control insect pests. Following traitments, the toxic compounds go to river and finally reach the sea. The recent development of biomarkers based on the study of biological responses of organisms to pollutants has provided the biochemical tools essential to the implementation of programmes for the monitoring of contaminants effects. Cholinesterase inhibition has been used for years as a marker of exposure to insecticides, on human of course but also on wild life to monitor effects of contaminants on living organisms. In the marine environment the choice of monitoring target species has been mainly carried on bivalve molluscs as the common mussel, the scallop or the oyster. But molluscs proved to be relatively insensitive to inhibitors when compared to vertebrate species. (*Peux tu mettre une reference ici ?*). But preliminary studies showed that inhibition curves did not followed a

pseudo first order kinetic but were biphasic. This suggested the presence of more than one cholinesterase in oyster.

In order to verify this hypothesis, we purified cholinesterases by affinity chromatography. The two cholinesterases were then separated by triton X-114 partitioning and binding to lectin. The specific kinetic behaviour towards substrate and inhibitor is determined and distribution of the two forms in different tissues of the common oyster is described.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Oysters are obtained alive directly from an oyster culturer in Fromentine (Atlantic coast of France). Animals are frozen for 24 hours at -20°C to make easier the sampling of the tissues. Preliminary studies (Bocquené, 1990) showed that the highest specific AChE activity in the oyster was found in the gills. Twenty kilograms of oysters are needed to obtain 300 g of gills.

Extraction of cholinesterases in the oyster

Extraction is performed using 20 mM Tris-HCl pH 7 plus 0.1% Triton X-100. Organs are homogenized 1/1 (W/V) for 1 minute using an Ultra Turrax. Extracts are then centrifuged at 10,000 g for 30 minutes and the operation is repeated with resuspension of the pellet until no cholinesterase activity is detected in the supernatant. The extract is then concentrated by ammonium sulfate precipitation : ammonium sulfate is added to the pooled supernatants from the gills to 70% saturation (0.4 g/ml) and mixed for 4 hours. The precipitate obtained after centrifugation at 10 000 g for 30 minutes is dissolved in 20 mM Tris-HCl pH 7 containing 0.1 % Triton X-100 and overnight dialyzed against the same buffer.

Chromatographies

affinity chromatography is performed on procainamide, a ligand specific of the choline binding site. The dialyzed extract is directly applied to an affinity column. Procainamide containing gel is prepared using ECH-Sepharose 4 B (from Pharmacia) as the coupling gel and EEDQ (N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy 1,2 -dihydroquinoline) from Sigma for ligand immobilisation. The loading buffer is 20 mM Tris-HCl pH 7, 0.1 % Triton X-100 and the elution buffer is 20 mM Tris-HCl pH 9.5 plus 0.1 % Triton X-100 containing 1 M NaCl and 1mM procainamide. Fractions exhibiting cholinesterase activity are pooled and stored at 4° C before use.

For chromatography on Concavalin-A sepharose, sample is loaded on the column in 20 mM Tris-HCl pH 7, 0.1% Triton X-100, 1M NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MnCl₂. Following washing with the same buffer, the bound proteins are eluted in 20 mM phosphate buffer pH 7 containing 10% methylmannose and 0.1% Triton X-100.

Triton X-114 partitioning

The non-ionic detergent Triton X-114 is used to separate amphiphilic cholinesterase from the hydrophilic form. Precondensed Triton X-114 (12 %) is prepared as described by Bordier (1981). Purified cholinesterases are added to the solution of detergent and kept for 15 minutes at 0° C until the solution is perfectly clear. Phase separation is then promoted at 30 ° C for 15 minutes. Triton X-114 phase containing the amphiphilic form of AChE is recovered by centrifugation at 30 ° C. The upper aqueous phase with hydrophilic cholinesterase and the Triton X-114 phase are kept separately and are subject to two new phase separations. Diluted Triton X-114 phase and aqueous phase are loaded on separated procainamide affinity columns for a further purification. Aliquots of each form are loaded on a non-denaturing electrophoresis.

Non-denaturing electrophoresis

Electrophoresis experiments are performed under non-denaturing conditions in 2-23% acrylamide gradient gel containing 0.25 % sodium deoxycholate (this negatively-charged detergent allows the migration toward the anode of hydrophobic forms by binding to the protein until they reach an acrylamide mesh size which blocks them) or 0.1% Triton X-100 (this non charged detergent binds to hydrophobic lipids when present and retains the cholinesterase at the top of the gel). Cholinesterase bands are stained following the procedure of Karnovsky and Roots (1964). Molecular weights are estimated by comparison with migration of high molecular weights standard proteins for non-denaturing electrophoresis gels (Pharmacia).

Phosphatidyl inositol-phospholipase C (PI-PLC) treatment

Phospholipase digestion of the amphiphilic form of cholinesterase by phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) from *Bacillus cereus* (Boehringer Mannheim) is performed at 37 ° C in 20 mM phosphate buffer pH7 for one hour. The conversion of amphiphilic form to soluble cholinesterase by phospholipase C (5 U/ml) is assessed and controlled by phase partition in precondensed Triton X-114 and by migration in a nondenaturing electrophoresis gel.

Activity, substrate and inhibitor specificities

Cholinesterase activity is routinely monitored according to Ellman et al. (1961) using acetylthiocholine at 1 mM as substrate in 20 mM phosphate buffer pH 7. One unit corresponds to the hydrolysis of 1 nmole of substrate per minute. Bradford's method (1976) is used for quantitative determination of proteins with BSA (bovine serum albumin) as standard. Cholinesterase activities are expressed as units and specific activities are given as units / mg protein, one unit corresponds to the metabolization of 1 nmole of acetylcholine / min.

The hydrolysis of three different substrates, acetylthiocholine (AcSCh), butyrylthiocholine (BuSCh) and propionylthiocholine (PrSCh) is followed for each molecular form with concentrations of substrate ranging from 5 μ M to 10 mM. at 25° C. Michaelis constant, K_m are determined by analysis of the Lineweaver-Burk transformation.

Sensitivity of each cholinesterase form to inhibition by three organophosphates, DNP (paraoxon), DFP (diisopropylfluorophosphate), iso-OMPA (tetraisopropyl pyrophosphoramidate) a specific inhibitor of human butyrylcholinesterase and three carbamates, eserine, carbaryl and carbofuran is investigated. Stock solutions of inhibitors are prepared in ethanol. The bimolecular reaction constant, k_i , that expresses the inhibitory power of the inhibitor is calculated by the dilution method of Aldridge (1950). Cholinesterase is incubated with the inhibitor before tipping the inhibition mixture into a solution of acetylthiocholine (1mM) to measure residual activity, by regressing residual enzyme activity ($\ln A/A_0$) against time, in these conditions k_i is given by the slope = $-k_i I$, I being the concentration of inhibitor.

Distribution of the different forms of cholinesterase in the tissues of oyster

As the two form differ in their reactivity towards paraoxon, the inhibition is used to assess the natural distribution of the distincts molecular forms of cholinesterase in the main organs of the oyster.

RESULTS

Extraction , purification and separation.

All the cholinesterase activity can be extracted by 20 mM Tris-HCl pH7, 0.1% Triton X-100, high ionic strength buffer did not released extra activity. The amount of cholinesterase activity wich could be extracted is investigated for the main tissues of the common oyster (table 1). Specific activities using acetylthiocholine as substrate show that the gills, the mantle and the hepatopancreas exhibit the highest cholinesterase activities in the oyster while activities measured in the two parts of the adductor muscle (the smooth ant the striated muscle) are unexpectedly poor. It must be noticed that the presence of high concentrations of sulfhydryl material in these extracts leads to a pre-dialysis before cholinesterase activity can be efficiently measured

When applied on procainamide affinity column, all the activity remains bound on the column, recovery ranges from 23 to 57 % of the original activity. This yield can be considered as relatively poor when compared with purification of other acetylcholinesterases. Similar ratios of the two forms (see below) was found on crude and on purified extracts showing that they can be purified onto procainamide column with identical efficiencies.

Characterization of the two forms

Electrophoresis of the crude extract as of the purified extract shows two bands migrating at $\cong 200$ kDa (form A) and $\cong 330$ kDa (form B) when performed in non denaturing condition on gradient gel in presence of deoxycholate (fig. 1). In these conditions, when the anionic detergent migrates in the gel, the hydrophobic (or amphiphilic) cholinesterase migrates until it reaches the gradient zone corresponding to its apparent molecular weight as an hydrophilic form (Fournier et al., 1987). When the sample is applied to a gel in presence of Triton X-100 instead of deoxycholate as detergent, it appears that the B form is not sensitive to the detergent and migrates to $\cong 330$ kDa as in the deoxycholate gel. By contrast, the A form is affected by the nature of the detergent, in presence of 0.1% Triton X-100, this form migrates higher in the gel. Following Triton X-114 partitioning, there are some activity in the two phases, detergent and aqueous. The detergent phase contains only the A form while the aqueous phase contains 95-98% of B form and some traces of A form. Successive phase separations did not extract the A form present in the aqueous phase leading to suggest that this protein is a degradation product of the amphiphilic A form present in the detergent phase resulting from the digestion of the hydrophobic counterpart.

Conversion of the A form to its soluble hydrophilic counterpart by PIPLC is followed by the control of cholinesterase distribution after phase partitioning in the presence of Triton X-114. Table 2 shows the AChE activities recovered in the aqueous phase in presence or absence (control) of PI-PLC. Evidence of the phosphatidylinositol anchorage of the hydrophobic form is given by the release of 92% of total activity in the supernatant d

The substrate specificity of the two forms toward acetylthiocholine iodide, butyrylthiocholine iodide and propionylthiocholine iodide is measured with 1 mM substrate. A form is most active against AcSCh (100%) with less activity against PrSCh (81%) and very poor activity against BuSCh (8.5%). B form has nearly the same activity for AcSCh and PrSCh with respectively 100% and 93 % but does not hydrolyse the BuSCh substrate at all. No activity can be measured for this thiocholine-ester whatever the substrate concentration is (from 5 μ M to 5 mM).

The two cholinesterases display an apparent Michaelian compartment in the range 5 μ M to 1 mM when acetylthiocholine is used as substrate. K_m s are in the same range (Table 3). The K_m of the A form for BuSCh is nearly the same that for AcSCh although BuSCh is poorly hydrolysed. At higher concentration of substrate (above 5 mM) the two enzymes are inhibited.

Inhibition experiments with organophosphate and carbamate inhibitors highlights the very strong difference in sensitivity between the two molecular forms. Apart from the case of the carbamate eserine, the B form proved to be almost insensitive to organophosphorous and carbamate compounds whereas the A form is very sensitive. Results expressed in table 4 shows that the membrane-bound cholinesterase is 40 000 fold more sensitive to DNP (paraoxon) and 16 000 fold more sensitive to carbofuran than the soluble form, that latter being only sensitive to eserine. The insensitivity of the soluble form is so great that the k_i for carbofuran reaches $135 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Distribution of the two cholinesterases in the main organs of the oyster

The existence of two forms of acetylcholinesterase in the gills of oyster differing in their reactivity with inhibitors such as paraoxon was an opportunity to analyse the percent composition for each molecular form in the different tissues of the oyster. This investigation was performed by incubation with 1 mM paraoxon of supernatants collected during the extraction phase in the different organs of the oyster. Results are given in table 5, showing important differences between the tissues. Both cholinesterases are present in each tested organ in different proportions but no clear predominance is to be done. It is to be noted that series of extractions from gills sampled on different periods of the year (December, February and May) result in modified distributions of cholinesterases in this organ in May compared with animals sampled in winter.

DISCUSSION

Evidence is given of the presence of two distinct cholinesterases in the common oyster. The structural and catalytic differences suggest that the two cholinesterases isolated from the gills are two separate proteins most likely encoded by two different genes.

The presence of several different genes in annelids, nematodes and molluscs results in a wide and complex polymorphism of cholinesterases in these species. In the nematodes *Panagrellus redividus* and *Steinernema carpocapsae*, AChE is encoded by two different genes (Mulder and Bakker, 1992. Arpagaus et al., 1994) and three different genes, *Ace-1*, *Ace-2*, *Ace-3* encode three acetylcholinesterase classes (A, B and C) in the nematodes *Caenorhabditis elegans*, *Meloidogyne arenaria* and *Meloidogyne incognita* (Chang and Opperman, 1991; Arpagaus et al., 1994). Two different acetylcholinesterases have been described in the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*) (Talesa et al., 1995). Adversely, only one gene has been described in insects (Hall and Kankel, 1976) and in Octopus (Talesa et al., 1995b).

The question still arises whether to know if both these enzymes are cholinesterases or nonspecific esterases which also metabolize acetylcholine. Although we do not know if these enzymes actually metabolize acetylcholine *in vivo*, several data suggest that they can be considered as cholinesterases. Both forms of the oyster are active against acetylthiocholine iodide. Km for acetylcholine is in the range of 10-100 μ M. They also are inhibited by eserine and by excess of acetylthiocholine iodide as most of cholinesterases.

Cholinesterases have been described and classified by many authors into two groups, acetylcholinesterase or butyrylcholinesterase (pseudo-cholinesterase) depending on the substrate hydrolysis and sensitivity to inhibitors. Both forms of the oyster are most active against acetylthiocholine iodide with less activity against propionylthiocholine iodide and butyrylthiocholine iodide. They also are inhibited by excess of acetylthiocholine iodide and are not sensitive to iso-OMPA which is identified as a pseudo-cholinesterase specific inhibitor (Toutant, 1989. Sine et al, 1992). At first, we are tempting to classify the two cholinesterases found in oyster as acetylcholinesterases. But this classification is clearly established only in vertebrate species where the two enzymes are very closed since conversion of acetylcholinesterase into a butyrylcholinesterase-like enzyme has been realized by substitution of a single aminoacid in the acyl pocket (Harel et al., 1993; Vellom et al., 1993). Classification of cholinesterases of invertebrates are more ambiguous. In insects, only one cholinesterase metabolizes acetylcholine and butyrylcholine to various degrees (Gnagey et al., 1987, Toutant, 1989, Zhu and Clark, 1994). Wachtendonk and Neef (1979) described one acetylcholinesterase in the haemolymph of the common mussel (*Mytilus edulis*) but four pseudo cholinesterases differing in their pharmacological behaviors. For Talesa et al., (1990), the cholinesterase extracted from the shellfish *Murex brandaris* is a propionylcholinesterase as PrSCh is a better

substrate than acetylthiocholine or butyrylthiocholine for this enzyme but more recently Talesa et al., (1995) use the term acetylcholinesterase for cholinesterases from the leech (*Hirudo medicinalis*, annelid) although the substrate preference of these cholinesterases is toward the propionylthiocholine. As a consequence, we prefer to use the term of cholinesterase for the oyster enzyme.

From the kinetic point of view, both forms, A and B, from oyster exhibit K_m for acetylthiocholine in the range of 10-100 μM . Similar results are reported for the same substrate as regards the detergent sensitive acetylcholinesterase from the leech (25 μM), the soluble acetylcholinesterase from the leech (70 μM), the acetylcholinesterase from the murex (78 μM), class A and class B from most nematodes (in the range of 10 μM). From the comparative analysis of K_m values, the two cholinesterases from the common oyster show characteristics comparable to those of other known cholinesterases from invertebrates and also from vertebrates.

The soluble cholinesterase from oyster is reported as being inaccessible to most irreversible inhibitors and thereby close to cholinesterases described as class C in numerous nematodes. This insensitivity to inhibitors makes these cholinesterases a special and unique case among known cholinesterases. As measurement of acetylcholinesterase inhibition in bivalves could be used as a biomarker of the effects of neurotoxic contaminants (including organophosphate and carbamate insecticides), the coexistence of two distinct forms, one being insensitive, was up to now a disadvantage for the bivalves to offer potential for monitoring of effects of inhibitors. Actually, though they exhibit poor levels of ChE activities, bivalves are considered as good target species very easy to sample through existing monitoring networks such as the American Mussel Watch or the French National Monitoring Network (R.N.O.) Now that differential properties of each cholinesterase are determined, specially in terms of sensitivity to 1 mM paraoxon, it can be now considered that isolation of the activity of the sensitive membrane-bound cholinesterase from the total cholinesterase activity would be a great improvement in the use of cholinesterases from oyster as a marker of effects of inhibitors. Activity of the sensitive fraction can be obtained by the difference between total cholinesterase activity and the total cholinesterase activity in presence of 1 mM paraoxon.

This work demonstrates that most of the organs of the common oyster *Crassostrea gigas* contain two distinct molecular forms of cholinesterase. But relative distribution seems to vary with the season. That may be explained by a change of the general metabolism of these organisms during the reproduction period (from May to September). It seems that distribution of cholinesterases is not only a function of the nature of the tissue but probably arises from

numerous and varying criteria including environmental parameters that are known to be conclusive for marine organisms.

Acknowledgments: This work was supported by grants from DREI (93030) and from DRET (94-084).

REFERENCES

- Aldridge, W.N. (1950). *Biochem. J.* **46**, 451-460.
- Arpagaus, M., Fedon, Y., Cousin, X., Chatonnet, A., Berge, J.B., Fournier, D. and Toutant J.P. (1994) *J.Biol.Chem.* **269**, 9957-9965.
- Arpagaus, M., Richier, P., Berge, J.B. and Toutant J.P. (1992) *Eur.J.Biochem.* **207**,1101-1108.
- Bocquené, G., Galgani, F. and Truquet, P. (1990) *ar. Environ. Res.* **30**:75-89.
- Bordier, C. (1981) *J.Biol.Chem.* **256**, 1604-1607.
- Bradford, M. (1976) *Analyt. Biochem.* **772**, 248-264.
- Chang, S. and Opperman, C.H. (1991) *Mol. Biochem. Parasit.* **49**. 205-214.
- Ellman, G.L., Courtney, K.O., Andres, V. and Featherstone, R.M. (1961) *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88-95.
- Fournier, D., Cuany, A., Bride, J.M. and Bergé, J.B. (1987) *J. Neurochem.* **49**, 1455-1461.
- Gnagey, A.L., Forte, M. and Rosenberry, T. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 13290-13298.
- Harel, M., Sussman, J.L., Krejci, E., Bon, S., Chanal, P., Massoulié, J. And Silman, I. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 10827-10831.
- Karnovski, M..J. and Roots L. (1964) *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 219-222.
- Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Kejci, E. and Valette, F.M. (1993) *Prog. Neurobiol.* **41**, 31-91.
- Mulder, J.G. and Bakker J. (1992). *Fundam. Appl. Nematol*, **15**,19-23.
- Sine, J.P., Toutant, J.P., Weigel P and Colas, B. (1992) *Biochemistry* **31**, 10893-10900.
- Talesa, V., Contenti, S., Mangiabene, C., Pascolini, R., Rosi, G. and Principato, B. (1990) *Comp. Biochem. Physiol.* **96C**, 39-43.
- Talesa, V., Grauso, M., Giovannini, E., Rosi, G. and Toutant, J.P. (1995). *Biochem. J.*, **306**, 687-692.
- Talesa, V., Grauso, M., Giovannini, E., Rosi, G. and Toutant, J.P. (1995b). *Neurochem. Int.* **27**, 201-211.

Toutant, J.P. (1989) *Prog. Neurobiol.* **32**, 423-446.

Toutant, J.P. and Massoulié, J. (1987) In "Mammalian ectoenzymes". Kenny and Turner (eds). Elsevier Science Publishers. Amsterdam. Biomedical Division. pp289-328.

Vellom D.C., Radic, Z., Li, Y., Pickering N.A., Camp S. and Taylor P. (1993) *Biochemistry* **32**, 12-17.

Von Wachtendonk, D. and Neef, J. (1979) *Comp. Biochem. Physiol.* **63 C**, 279-286.

Zhu, K.Y. and Clark, J.M. (1995) *Pest. Biochem. Physiol.* **51**, 57-67.

	Gills	Hepatopan creas	Mantel	Labial palps	Striated adductor muscle	Smooth adductor muscle
Specific AChE activity	28.1 (6.4)	25.5 (9.0)	24.3 (5.8)	13 (8.6)	6.9 (9.9)	6.2 (8.5)

Table 1 : Specific AChE activity (in nmoles / min / mg protein) in the main tissues of the common oyster. Number in bracket is the protein concentration in mg/ml of crude extract.

	Control	Pi-PLC treated
AChE in supernatant	2.25	27.75
AChE in TX 114 phase	25.5	2.25
% of hydrophilic form	8.8	91.9

Table 2 : Effect of PI-PLC digestion on the partitioning in Triton X-114 of A form of oyster. (activity is given in units / 100 μ l)

A form	Km (μ M)	Kss (mM)
AcSCh	77.6	13.3
BuSCh	63.5	(1)
PrSCh	124	(1)

B form	Km (μ M)	Kss (mM)
AcSCh	18	15.13
BuSCh	(2)	(1)
PrSCh	39	(1)

Table 3 : Kinetic characteristics of separated acetylcholinesterase forms from the common oyster. (1) : not measured, (2) : not detected

	A form	B form
DFP	$2.0 \cdot 10^3$	1.3
DNP	$3.0 \cdot 10^5$	7.6
Iso-OMPA	3.0	*
Eserine	$4.7 \cdot 10^5$	$2.7 \cdot 10^4$
Carbofuran	$2.2 \cdot 10^6$	135
Carbaryl	$6.7 \cdot 10^4$	62.5

Table 4 : Bimolecular reaction constant (k_i in $M^{-1}min^{-1}$) of six inhibitors on the two classes of oyster AChE (* =no inhibition at 1 mM iso-OMPA).

Tissue		Total AChE activity	AChE activity in presence of 10^{-3} M paraoxon	% of membrane-bound AChE	% of soluble AChE
Gills	a	25.2 ± 0.7	4.1 ± 0.3	83.6 %	16.4 %
	b	63.8 ± 4.3	11.3 ± 4.3	82.4%	17.6 %
	c	30.8 ± 0.8	17.0 ± 1.7	45 %	55 %
Hepatopancreas		34.2 ± 4.9	9.0 ± 1.2	73.7 %	26.3 %
Mantel		19.6 ± 2.0	16.7 ± 2.7	14.9 %	85.1 %
Labial palps		22.7 ± 2	18.7 ± 1.65	17.5 %	82.5 %
Striated adductor muscle (grey part)		39.5 ± 4.1	13.2 ± 3.0	66.6 %	33.4 %
Smooth adductor muscle (white part)		36.1 ± 1.1	15.4 ± 0.3	57.4 %	42.6 %

Table 5 : Distribution of the two forms of AChE in the tissues of the common oyster. Activities are expressed as nmoles of ASCh hydrolyzed / 100 μ l extract. Results are given as mean \pm S.D of 4 determinations.(Gills a :animals sampled in Dec.94. b :animals sampled in Feb.95. c :animals sampled in May 95.)

CHAPITRE 2 :

LES INHIBITEURS DE CHOLINESTERASE

CHAPITRE 2. LES INHIBITEURS DE CHOLINESTERASE

Introduction: les molécules contaminantes douées de pouvoir inhibiteur des cholinestérases

Parmi les nombreuses molécules susceptibles d'inhiber les cholinestérases, les composés organophosphorés (ou organophosphates: OP) et les carbamates (C), tous deux utilisés comme matière active dans la préparation d'insecticides, sont les plus puissants. Les scientifiques ne sont cependant pas unanimes pour attribuer aux seuls OP et C les effets inhibiteurs mesurés et l'absence d'information sur les niveaux de présence de ces insecticides dans le milieu marin et sur la synergie des effets de mélanges de contaminants d'origine diverse ne permet pas d'attribuer les effets uniquement à la présence d'OP et C dans l'environnement.

D'autres molécules ont été suspectées d'être responsables des effets inhibiteurs sur les cholinestérases mesurés dans le milieu, parmi celles-ci on peut citer les insecticides pyrèthrines ou pyrèthroïdes, certains ions métalliques tels que le cuivre ou l'arsenic qui présentent *in vitro* des effets inhibiteurs ou encore certaines phytotoxines libérées lors d'épisodes de proliférations phytoplanctoniques.

La liste des inhibiteurs potentiels des cholinestérases est longue et celle dressée par Olson et Christensen en 1980 (tableau 10) n'est certainement pas exhaustive. De nombreuses molécules montrent un comportement inhibiteur *in vitro* encore faut-il que ces molécules soient considérées comme des contaminants significatifs du milieu marin. La présence d'alcaloïdes tels que l'ergotamine, ou l'atropine, ou celle de neuromédiateurs comme la sérotonine ou l'adrénaline dans le milieu marin à des concentrations susceptibles d'entraîner des effets inhibiteurs sur les organismes est hautement improbable pourtant la présence étonnante de caféine, d'origine évidemment anthropique, a été régulièrement notée par les chimistes à des teneurs proches du ng/l assez loin en mer.

Composé	CI ₅₀	Composé	CI ₅₀
Eserine	3.2 x 10 ⁻⁷	Dieldrin	2.2 x 10 ⁻³
Néostigmine	7.1 x 10 ⁻⁷	Ergotamine	2.5 x 10 ⁻³
Carbaryl	1.0 x 10 ⁻⁵	AsO ₄ ³⁻	3.5 x 10 ⁻³
Malaoxon	1.8 x 10 ⁻⁵	Méthyl Hg	5.0 x 10 ⁻³
AsO ₂ ⁻	3.2 x 10 ⁻⁵	Caféine	5.0 x 10 ⁻³
Cu ²⁺	1.6 x 10 ⁻⁴	Diazinon	5.0 x 10 ⁻³
Au ³⁺	5.0 x 10 ⁻⁴	Fe ³⁺	5.7 x 10 ⁻³
Pd ²⁺	5.0 x 10 ⁻⁴	Adrénaline	5.7 x 10 ⁻³
Cd ²⁺	5.7 x 10 ⁻⁴	Noradrénalin	5.7 x 10 ⁻³
Pd ⁴⁺	6.4 x 10 ⁻⁴	Atropine	5.7 x 10 ⁻³
Ag ⁺	1.0 x 10 ⁻³	Nicotine	5.7 x 10 ⁻³
Au ⁺	1.4 x 10 ⁻³	Malathion	5.7 x 10 ⁻³
Hg ²⁺	1.6 x 10 ⁻³	Pb ²⁺	7.1 x 10 ⁻³
Sn ²⁺	1.8 x 10 ⁻³	Cr ³⁺	7.1 x 10 ⁻³
Pt ⁴⁺	2.2 x 10 ⁻³	Co ²⁺	7.1 x 10 ⁻³
Cr ₂ O ₇ ²⁻	2.2 x 10 ⁻³	Zn ²⁺	1.0 x 10 ⁻²
Sn ⁴⁺	2.2 x 10 ⁻³	Al ³⁺	1.8 x 10 ⁻²

Tableau 10 : CI₅₀ (concentrations en M entraînant une inhibition d'activité de 50%) des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase du vairon (*Pimephales promelas*) d'après Olson et Christensen (1980).

Les principales familles d'inhibiteurs sont détaillées dans les paragraphes suivants et leur implication dans les inhibitions constatées dans le milieu est discutée. Parmi les plus puissants inhibiteurs figurent donc en tête de la liste d'Olson et Christensen les insecticides carbamates et les organophosphorés.

2-1. Les produits phytosanitaires

L'utilisation de molécules issues de la chimie est la raison essentielle de l'augmentation de la production agricole dans la plupart des pays et si le terme générique de pesticides a une perception péjorative auprès du grand public il ne faut pas perdre de vue qu'un tiers des cultures est encore détruit pendant la croissance, la récolte et le stockage. Aux U.S.A , la production annuelle de ces produits, dits phytosanitaires ou pesticides, atteint 500 000 tonnes, composées de

900 molécules diverses entrant dans la composition de 25 000 formulations déposées (Fikes, 1990). En France, en 1985, la production totale est de 64 160 tonnes dont 6 260 tonnes d'insecticides. Le terme générique de pesticides recouvre une gamme très large de biocides à visée spécifique tels que les insecticides, les fongicides, les herbicides, les nématicides. Les quantités utilisées sont en augmentation permanente puisqu'en France la production passe de 24 400 tonnes en 1974 à 92 500 tonnes en 1987. De la même manière la consommation d'insecticides relative aux cultures du maïs en Bretagne est passée de 500 tonnes en 1986 à 1 500 tonnes en 1990 (Gillet, 1992). Il faut noter que les informations concernant les chiffres de production, de vente et d'utilisation de ces produits sont difficiles à obtenir car elles relèvent souvent d'informations industrielles ou commerciales confidentielles et les chiffres dont on dispose sont parfois des estimations calculées à partir des surfaces agricoles traitées et des doses conseillées à l'épandage. Malgré cela les recoupements d'informations permettent des estimations fiables.

Les accidents consécutifs aux traitements avec ces insecticides en milieu marin ou sur la frange littorale sont nombreux. On peut citer en France, en 1991, la perte de plusieurs tonnes de crevettes japonaises *Paeneus japonicus* dans une station aquacole du Languedoc consécutive à des dispersions aériennes de fénitrothion dans le cadre de la démoustication.

Dans ce chapitre, on s'attardera plus particulièrement sur les organophosphorés et les carbamates pour les quantités importantes dispersées annuellement en France (\cong 3 200 tonnes) ainsi que pour leur mode d'action spécifique. On mentionnera plusieurs familles de pesticides dont certaines molécules ont été associées à des effets inhibiteurs. Certaines toxines algales ont un pouvoir anticholinestérasique fort, leur éventuelle présence en milieu marin est discutée. Quelques informations concernant les effets inhibiteurs de sels métalliques ou métalloïdes compléteront ce chapitre ainsi qu'une étude plus détaillée des effets conjugués de mélanges de contaminants sur l'acétylcholinestérase de quatre espèces marines.

2-1-1. Organophosphates et carbamates

Parmi les contaminants majeurs de l'environnement, les pesticides causent de sérieux problèmes écologiques tant par leur forte rémanence (insecticides organochlorés) que par leur haute toxicité (insecticides organophosphorés et carbamates). Le nombre important de ces molécules toxiques susceptibles de

contaminer l'environnement a conduit les autorités européennes à dresser, dès 1976, une liste noire de 39 molécules dont la surveillance est prioritaire (tableau 11). Parmi ces composés figurent 19 molécules organophosphorés, soit un peu plus de 50% des produits. Curieusement la liste dressée par le Comité de liaison "eaux-produits antiparasitaires" émanants des ministères français de l'agriculture, la santé et l'environnement (tableau 12) n'en comporte plus que 3 sur trente produits.

Aldrin	Disulphoton (OP)	Monolinuron
Arazine	Endosulphan	Omethoate (OP)
Azinphos-ethyl (OP)	Endrin	Oxydemeton-methyl (OP)
Azinphos-methyl (OP)	Fenitrothion (OP)	Parathion-ethyl (OP)
Chlordane	Fenthion (OP)	Parathion-methyl (OP)
Coumaphos (OP)	Heptachlor	Phoxim
2,4-D	Hexachlorobenzene	Propanil
DDT	Linuron	Pyrazon (OP)
Demeton (OP)	Malathion (OP)	Simazine
Dichlorprop	MCPA	2,4,5-T
Dichlorvos (OP)	Mecoprop	Triazophos (OP)
Dieldrin	Metamidophos (OP)	Trichlorfon (OP)
Dimethoate (OP)	Mevinphos (OP)	Trifluralin

Tableau 11 : Liste des 39 pesticides de la directive 76/464/EEC concernant la pollution par des substances dangereuses déchargées dans l'environnement aquatique (Barcelo, 1993).

	Alachlore	Captane	
Atrazine	Aminotriazole	Carbendazime	
Aldicarbe (C)	Cyanazine	Chlortoluron	Diquat
Dinoterbe	Ioxynil	Cyproconazole	Fenpropimorphe
Diuron	Isoproturon	Fluroxypyr	Flusilazole
Endosulfan	Linuron	Folpel	Triallate
Lindane	O-déméton (OP)	Méthomyl	Chlorpyriphos-éthyl
Trifluraline	Simazine	Pendiméthaline	(OP)
	Terbutylazine	Tridémorphe	

Tableau 12 : Liste nationale des 30 substances actives prioritaires établie par le Comité de liaison eau-produits phytosanitaires des Ministères de l'Agriculture, de l'Environnement et de la Santé (20 mai 1994).

Bien que le transfert de ces molécules dans l'environnement est généralement diffus et chronique des accidents tels que les incendies des entrepôts Sandoz en 1986 où 10 tonnes d'organophosphorés furent introduits dans le Rhin ou la perte de plusieurs tonnes d'un carbamate, le furathiocarbe, par un porte container en Décembre 1993 en Manche peuvent avoir des conséquences dramatiques sur l'écologie de la faune aquatique et des répercussions économiques graves sur la conchyliculture d'une région entière quand ils touchent le milieu marin. La nécessité est apparue de développer des outils biologiques plus ou moins spécifiques permettant une évaluation des effets précoces, ceux qui constituent les premières évidences de perturbations au niveau moléculaire. Depuis le début des années 1970, l'inhibition des cholinestérases et plus particulièrement celle de l'acétylcholinestérase est appliquée à l'identification des effets des composés organophosphorés et des carbamates sur les espèces aquatiques (Weiss et Gakstatter, 1964; Coppage et Braidech, 1976 ; Nemcsok *et al.*, 1985 ; Zinkl *et al.*, 1987 ; Day et Scott, 1990). L'existence d'effets inhibiteurs à seuils extrêmement bas suggère que la détection de l'inhibition est possible après une exposition à des concentrations en organophosphorés ou carbamates situées entre 0.1 et 1 µg/l (Klaverkamp et Hobden, 1980 ; Habig *et al.*, 1986 ; Bocquené et Galgani, 1991). Mais les données chimiques concernant les niveaux de contamination des différents compartiments de l'environnement par ces composés sont rares sinon quasiment inexistantes.

Il n'existe pas de méthode de détermination quantitative des organophosphorés totaux et la recherche de ces produits dans l'environnement se fait molécule par molécule. Actuellement il existe une centaine de molécules d'organophosphorés différentes dont une moitié est utilisée dans les formulations insecticides. Quant aux carbamates, ils sont représentés par une cinquantaine de molécules distinctes dont une vingtaine régulièrement employée comme insecticides et nématicides.

2-1-1-1. Les organophosphorés

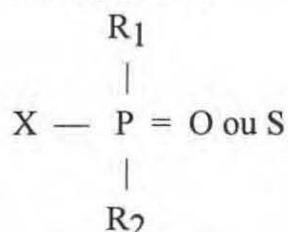
Le premier rapport de synthèse d'un organophosphate, le tétraéthylpyrophosphate date de 1854 et fut présenté à l'Académie des Sciences par le français Philipe de Clermont, mais il faut attendre 1932 pour que les propriétés inhibitrices de ces molécules soient décrites. C'est l'entreprise allemande I.G. Farben qui développe les premiers insecticides organophosphorés, notamment le parathion. Par la suite seront synthétisés les agents chimiques tels que le diisopropylfluorophosphate (DFP) puis les puissants agents G (sarin et soman) (Koelle, 1994). Au début des années 70, le développement des OP en tant qu'insecticides est favorisé par la

limitation voire l'interdiction des composés organochlorés tels que le DDT interdit d'utilisation, en France, en 1972. Les organochlorés sont en effet particulièrement rémanents et leur comportement lipophile marqué en fait des substances extrêmement bioaccumulables pour un effet toxique modéré. Les organophosphorés s'imposent rapidement par une très grande efficacité notamment contre les insectes et leur comportement dans l'environnement est considéré comme relativement inoffensif quand on les oppose aux organochlorés. Il faut toutefois pondérer ce jugement car si ces composés sont effectivement beaucoup plus instables que leurs congénères organochlorés les persistances d'action peuvent être importantes particulièrement dans les sols et les sédiments. Compte tenu de leur très forte toxicité ces molécules ne doivent en aucun cas être considérées comme étant écotoxicologiquement négligeables.

Enfin quelques composés organophosphorés ne sont pas utilisés pour leurs propriétés insecticides mais comme défoliants, c'est le cas du Tri Butyl Phosphorotrithioate (DEF) qui reste néanmoins un puissant inhibiteur de cholinestérases (Habig et Di Giulio, 1988).

2-1-1-1-1. Structure chimique des OPs

Chimiquement parlant, les OP sont des dérivés esters, amides ou thiol de l'acide ortho et thiophosphorique de formule générale:



R1 et R2 sont des chaînes alkoxy ou aryloxy et X est un groupe aliphatique ou aromatique facilement détachable d'où le terme de groupe partant ou "leaving group" utilisé par les anglosaxons. La variabilité du groupe partant est responsable d'une très grande spécificité dans le spectre biocide des organophosphorés (Fikes, 1990. Fukuto, 1990).

Une centaine d'organophosphorés différents a atteint le stade commercial et selon leur structure chimique ces molécules vont présenter des propriétés différentes, notamment un comportement toxique et une persistance dans l'environnement distincts. Parmi les OP les plus utilisés on peut citer l'azynphos-méthyl, le chlorfenvinphos, le chlorpyrifos, le déméton, le diazinon, le dichlorvos, le fénitrothion, le malathion, le parathion, la phosalone, le téméfos, le terbufos (Tronczynski, 1990. Barcelo et al., 1991. Lartiges et Garrigues, 1993.)

De nombreux OP insecticides se présentent sous la forme P = S (forme thio des phosphorothionates) plutôt que P = O (forme oxon). Les formes soufrées (thio) ne sont pas des inhibiteurs puissants des cholinestérases et nécessitent une activation métabolique qui aboutit à la forme oxon fortement inhibitrice des AChEs, un mécanisme qui intervient généralement *in vivo* sous l'action des systèmes à oxydases multiples (M.F.O). La nature de cette liaison sur le phosphore s'exprime souvent dans le nom commun de la matière active ainsi le parathion, le fénitrothion et le malathion sont les formes thio de leurs congénères paraoxon, fénitroxon et malaaxon. Si la forme thio est la plus stable, la forme oxon est la forme active des OP; c'est elle qui est responsable des formidables propriétés anticholinestérasiques de ces insecticides. Thirugnanam et Forgash (1975) observent un effet toxique 50 000 fois plus important entre la forme thio peu toxique du téméphos et son analogue oxygéné. Kobayashi *et al* (1986) font le même constat en étudiant les effets du fénitrothion et de son oxoforme sur la crevette japonaise (*Penaeus japonicus*).

2-1-1-1-2. Apports, transfert et teneurs en OPs dans l'environnement

Les apports de pesticides dans l'environnement et notamment dans les milieux aquatiques sont de nature diffuse et chronique. Issus pour l'essentiel de traitements agricoles ou de traitements de démoustication les apports résultent d'épandages multiples au cours de l'année. Encore est-il très difficile de distinguer dans ces apports la part, sans doute non négligeable, des usages domestiques.

Sur la vigne ou le maïs certains traitements sont hebdomadaires. En France on établit à 1 647 tonnes la consommation de matière active de produits organophosphorés pour l'année 1985 et à 1 797 tonnes pour l'année 1990 (source UIPP, 1991).

Les rejets directs sont de nature accidentelle, l'incendie des Entrepôts Sandoz, en Suisse en 1986, évoqué précédemment, a provoqué une contamination brutale et massive des eaux du Rhin entraînant une véritable catastrophe écologique pour la faune aquatique et responsable de la disparition de 220 000 kg d'anguilles sur 400 km de fleuve (Capel *et al.*, 1988). S'il est admis que les cours d'eau sont la voie principale de contamination des réservoirs d'eaux douces et de l'océan, la dispersion et le transfert des organophosphorés par voie atmosphérique sont importants compte tenu de la forte pression de vapeur des OP et du type d'épandage. Barcelo *et al.* (1991) estime à 40% le transfert atmosphérique du fénitrothion. Mais les mécanismes qui régissent la migration de ces molécules sont extrêmement complexes puisqu'ils sont spécifiques de chaque composé et de ce fait encore peu élucidés. Les OP présentent une solubilité dans l'eau très

variable allant de l'insolubilité totale (téméphos) à une très forte solubilité (acéphate = 790 g/l) mais la grande majorité montre une solubilité dans l'eau relativement faible entre 0.4 mg/l (chlorpyrifos) et 150 mg/l (malathion). En revanche les OP qui présentent les plus faibles solubilités dans l'eau montrent un comportement lipophile qui explique leur bioaccumulation dans les graisses et le tissu hépatique. Chez l'anguille (*Anguilla anguilla*) contaminée par 0.056 mg/l de diazinon, les facteurs de bioconcentration (BCF) sont de 800 dans le foie et 1600 dans le muscle (Sancho et al., 1993). Pour les mêmes raisons de diversité moléculaire, la dégradation de ces produits dans l'environnement est difficile à appréhender par un modèle commun et les informations, quand elles sont disponibles, sont particulières à une molécule donnée. On admet cependant les deux voies classiques de dégradation des structures organiques, c'est-à-dire les voies de dégradation chimique (photolytique et hydrolytique) et biologique (métabolique). Si les mécanismes sont à peu près connus, les différents métabolites des OP n'ont été décrits que pour quelques produits. Il est à peu près certain que les organophosphorés n'ont pas la rémanence des organochlorés mais leur persistance dans l'environnement est aussi très variable. Les temps de demi-vie sont fonction de nombreux paramètres environnementaux où le pH et la température du milieu jouent un rôle majeur de même que l'exposition à la lumière. Selon l'utilisation de l'insecticide, traitement des parties aériennes des cultures ou traitement des sols, la persistance est sensiblement différente.

Le tableau 13 présente des valeurs de demi-vie de quelques OPs mesurées in vitro, dans des conditions de laboratoire différentes (notamment de température et d'éclairage), en milieu eau douce (Franck *et al.*, 1991) et eau saumâtre (20‰) (Lacorte *et al.*, 1995).

	Temps de demi-vie en jours en eau douce		Temps de demi-vie en jours en eau saumâtre	
	pH = 8.2		pH = 7.8	
	4° C	21° C	(7-15°C)	
Terbufos	34	2,3	-	
Diméthoate	142	34	-	
Méthidathion	20	3.6	9.9	
Fenthion	-	-	4.6	
Chlorpyrifos	24	4,8	11.1	
Diazinon	45	14	10.6	

Tableau 13 : Temps de demi-vie de quelques OPs en eau douce à 4°C et 21°C (Franck *et al.*, 1991) et en eau saumâtre à 20 ‰ NaCl à température ambiante (Lacorte *et al.*, 1995).

Les informations obtenues par ces équipes ne peuvent évidemment pas être extrapolées au milieu dans des conditions environnementales réelles mais elles permettent d'affirmer que, malgré une instabilité plus forte que celle des composés organochlorés, la rémanence des OPs n'est pas nulle. Les données dans le milieu sont plus rares et plus complexes. Néanmoins quelques études disponibles font état de concentrations dans l'eau, le sédiment et la matière vivante égales et supérieures aux seuils d'induction d'effets mesurables. Ainsi Tully et Morrissey (1989) notent des teneurs extrêmes en dichlorvos de 0.13 µg/l à 25 m de profondeur dans les eaux de la baie de Beirtreach Bui en Irlande lié au traitement des élevages de saumon en milieu ouvert avec du dichlorvos. Les accidents liés à l'usage d'organophosphorés dans les fermes d'aquaculture sont communs. Ainsi Horsberg et al. (1989) signalent trois épisodes de mortalités importantes dans des fermes d'élevage de saumon après usage de trichlorfon et de dichlorvos. Les animaux morts présentaient des inhibitions de 80% de l'activité AChE et une bioaccumulation hépatique de 200 µg/kg. Barcelo et al. (1991) mesurent des concentrations en fénitrothion atteignant 60 µg/kg de chair chez la moule (*Mytilus galloprovincialis*) et 90 µg/kg chez une espèce de palourde (*Tapes semidecussatus*) dans le delta de l'Ebre (Espagne) plusieurs semaines après le traitement aérien des rizières, le même produit est retrouvé à une concentration stable de 3 µg/kg de sédiment 8 mois après l'épandage (Durand et Barcelo, 1992). De même d'importantes traces de téméphos sont retrouvées par Lores et al. (1985) dans des marécages de Floride ; 48 heures après l'épandage aérien des concentrations atteignant 62 µg/l sont mesurées dans les marais.

En fait il apparaît que la persistance de ces molécules est directement liée à leur solubilité reflétée par le coefficient de partition octanol/eau (K_{OW}). L'insolubilité du téméphos et la faible solubilisation du chlorpyrifos dans l'eau (0.4 mg/l) expliquent qu'on retrouve majoritairement ces composés dans l'environnement marin sous forme adsorbée et associée aux particules en suspension. Les travaux de Readmann et al. (1992) font état de concentrations en chlorpyrifos égales à 34.2 mg par kilo de sédiment dans certaines régions du Costa Rica. En revanche Wang et al. (1987) concluent à la non-persistance du fenthion dans les eaux estuariennes soumises à marée : les concentrations retrouvées dans en mer vont de 1.69 µg/l, 45 minutes après l'épandage, jusqu'à un niveau non détectable après 24 heures.

En France, à ma connaissance, si on excepte les eaux douces superficielles, de telles données sur les niveaux de contamination par les OPs n'existent pas.

2-1-1-2-3. Mécanismes d'inhibition des cholinestérases par les OPs

L'inhibition ou l'inactivation des cholinestérases est le mode d'action des OPs et des Cs.

L'activité insecticide est directement due aux propriétés de phosphorylation ou de carbamylation de l'acétylcholinestérase bien que d'autres effets notamment les effets de neuropathie retardée (NTE, Neurotoxic Esterase ou Neuropathy Target Esterase chez les Anglo-Saxons) soient connus dans les cas d'inhibition liés à certains organophosphorés.

L'inactivation de l'AChE résulte dans l'accumulation de l'acétylcholine à tous les sites de transmission cholinergique. Sur les récepteurs muscariniques l'accumulation de l'ACh provoque l'augmentation ou la persistance du signal (excitateur ou inhibiteur), sur les récepteurs nicotiniques l'effet est d'abord excitateur puis inhibiteur.

A la différence de la simple fixation réversible des ammoniums quaternaires sur le site anionique des cholinestérases, l'inhibition de l'acétylcholinestérase par OP est irréversible et est liée à la phosphorylation du site estérasique. Le mécanisme de phosphorylation s'apparente à l'acétylation dans l'hydrolyse normale de l'acétylcholine. La différence tient dans la très forte stabilité de l'enzyme phosphorylée qui, au contraire de l'AChE acétylée dont la demi-vie est de l'ordre de 0.1 milliseconde, présente une stabilité plus grande d'un facteur 10^7 (Eto, 1974).

Suivent deux réactions possibles:

-la vitesse de réactivation spontanée dépend étroitement de la nature des groupes substitués restant R_1 et R_2 et non pas du groupe partant X qui a été perdu au cours de la phosphorylation. Cette hydrolyse du complexe phosphorylé est généralement lente et dépend aussi de facteurs tels que la température et le pH mais aussi de molécules comme les oximes administrées dans les cas d'intoxication sévère chez l'homme et qui catalysent la réactivation.

-le vieillissement ou "ageing" correspond au passage de l'enzyme phosphorylée d'un état réactivable à une forme stable insensible aux effets réactivateurs de composés nucléophiles tels que les oximes. Ce processus appelé "ageing" car il est fonction du temps correspond à une réaction de déalkylation des groupes restant fixés sur l'enzyme. Il peut être plus ou moins rapide en fonction de la nature de l'organophosphoré et il est à l'origine de la notion d'irréversibilité liée à l'inhibition par les OP.

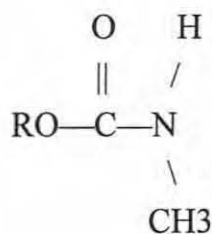
2-1-1-2. Les carbamates

Les carbamates présentent une structure chimique très différente des organophosphorés, ils ont néanmoins avec ces derniers de nombreuses caractéristiques communes notamment du point de vue dispersion, transfert et toxicité.

Les quantités de carbamates épandues chaque année en France métropolitaine sont en 1990 du même ordre que celles relatives aux organophosphorés. La consommation atteint 1 692 tonnes de matière active par an mais il faut souligner que la progression des carbamates sur le marché des insecticides a connu un véritable "boom" depuis 1985 où la consommation était établie à 1 136 tonnes.

2-1-1-2-1. Structure chimique des carbamates

Les carbamates apparaissent vers la fin des années quarante et on dispose aujourd'hui d'une cinquantaine de molécules actives qui font des carbamates des insecticides en constante progression. De la même manière que les organophosphorés, leur essor semble lié aux limites imposées par de nombreux états à l'usage des insecticides organochlorés. Sur le plan chimique les carbamates insecticides (les carbamates herbicides et fongicides ne sont pas traités ici) sont en réalité des méthylcarbamates dérivés de l'acide méthylcarbamique de formule générale:



R est une chaîne alkyl ou aryl.

De manière générale les carbamates sont des composés présentant une solubilité dans l'eau plus forte que celle des OP, les sources potentielles de dispersion sont de même nature et essentiellement d'origine agricole mais il est extrêmement difficile de quantifier les apports liés aux usages domestiques. Le transfert de ces composés vers les milieux aquatiques se fait principalement à travers les eaux de ruissellement qui lessivent les zones d'épandage. Les processus de dégradation sont étroitement liés à la nature de chaque molécule et dépendent pour l'essentiel des conditions de température et de pH : ainsi la demi-vie du carbaryl à pH 10 est de seulement 15 minutes, elle passe à 10 jours à pH 7 (WHO, 1986). En réalité les méthylcarbamates sont très sensibles à l'hydrolyse alcaline mais sont plutôt

stables à des conditions de pH neutre ou acide. La voie principale de métabolisme est oxydative et associée au système MFO. De même que pour les OPs l'oxydation des carbamates est considérée comme étant une activation, ainsi le métabolisme de l'aldicarbe en sulfoxyde d'aldicarbe multiplie par 10 les capacités anticholinestérasiques de l'aldicarbe.

Parmi les carbamates insecticides les plus utilisés on citera l'aldicarbe, le carbaryl, le carbofuran, le carbosulfan, le furathiocarbe.

2-1-1-2-2. Apports, transfert et niveaux des carbamates dans l'environnement

Les mécanismes de transfert et de dégradation sont semblables aux organophosphorés. On admet que les carbamates sont parmi les insecticides les plus rapidement dégradés bien que certains produits de dégradation semblent plus persistants que la molécule dont ils sont issus, c'est le cas notamment du carbofuran (Gupta, 1994) pour lequel paradoxalement la durée d'action dans le sol atteint 50 jours (ACTA, 1993). Les données sur les niveaux de présence de ces molécules dans les différents compartiments de l'environnement sont encore plus rares pour les carbamates que pour les organophosphorés. La présence du carbofuran à des concentrations atteignant 2.1 µg/l a été relevée en 1987 dans la rivière Sacramento aux U.S.A. (Harrington et Lew, 1989, cité dans Gupta, 1994). En France la présence du carbofuran a été mesurée dans les canaux agricoles des marais de Charente Maritime (Munsch, 1995) ou encore dans certaines rivières bretonnes (la Seiche, l'Horn) à des niveaux de l'ordre de 0.25 µg/l (Gillet, 1994).

2-1-1-2-3. Mécanismes d'inhibition des cholinestérases par les carbamates

L'inhibition de l'acétylcholinestérase par un carbamate intervient par un mécanisme identique à celui décrit précédemment dans les inhibitions par OP. La première étape du processus est la formation d'un complexe enzyme-inhibiteur avec carbamylation de l'hydroxyle de la sérine impliquant l'inhibition. Bien que les premières étapes soient les mêmes, il y a d'importantes différences dans le comportement de l'enzyme selon l'inhibiteur. En particulier la régénération spontanée de l'enzyme carbamylée en une enzyme de nouveau active est rapide, comparée à sa congénère phosphorylée. On admet donc que l'inhibition des cholinestérases par les carbamates est de manière générale réversible. Il faut toutefois être prudent et conserver à l'esprit que les comportements inhibiteurs de ces molécules sont toujours intimement liés à la nature des divers groupements R et X qui les composent.

De par leur structure chimique, les carbamates n'induisent pas d'effets de neuropathie retardée (NTE).

2-1-2. Pyrèthri-noïdes, triazines et paraquat.

Les **Pyrèthri-noïdes** ou pyrèthroïdes sont des composés synthétiques proches des pyrèthrines naturelles utilisés, souvent en association avec d'autres insecticides, dans les produits domestiques de lutte contre les moustiques, guêpes, cafards etc... Les pyrèthrines végétales sont préparées à partir de fleurs de plantes africaines (*Crysen-themum*) et provoquent par contact la paralysie des insectes. Le prix de revient élevé de ces molécules en limite pour l'instant l'usage. Elles ne présentent pas de toxicité vis à vis de l'homme en revanche elles sont reconnues toxiques pour les poissons.

La consommation de ces composés reste faible mais en totale expansion puisque les tonnages sont passés de 101 tonnes par an en 1985 à 383 tonnes en 1990.

La cyperméthrine est l'une des molécules caractéristiques du groupe. Elle est quasiment insoluble dans l'eau (0.009 mg/l), très soluble dans les lipides et de ce fait extrêmement bioaccumulable notamment chez le poisson (le BCF dépasse 1000). Cette molécule est considérée comme très toxique pour les espèces aquatiques et les CL₅₀ disponibles se situent entre 0.4 et 2.8 µg/l.

Les mécanismes de toxicité de ces molécules sont dirigés contre le système nerveux et les études engagées sur ces mécanismes suggèrent que la cible des pyrèthri-noïdes est le canal sodium (WHO/IPCS, 1989). Les effets toxiques de ces molécules résultent aussi de leur capacité d'inhibition des cholinestérases. Davies et Cook (1993) signalent une mortalité massive de macroinvertébrés après un traitement aérien à la cyperméthrine et une dépression significative de l'activité AChE de muscles de truites capturées dans les rivières alentour. Singh et Agarwal (1987) mesurent une inhibition de l'activité AChE sur le mollusque *Lymnaea acuminata* après une exposition à une molécule voisine, la perméthrine. L'effet inhibiteur des cholinestérases de poisson par les pyrèthri-noïdes est confirmé par Ghosh (1990) dans tous les tissus du tilapia (*Tilapia mossambica*) exposé à des concentrations sublétales de fenvalérate. De même Reddy et Philip (1994) mesurent une inhibition de l'AChE de 30 à 40% dans les branchies, le muscle et le foie et de 60% dans le cerveau de carpe exposée à 20 µg/l de cyperméthrine. Au contraire Davies et al. (1994) mesurent une activation de l'ordre de 20% de l'activité AChE de truites exposées à 0.9 µg/l de cyperméthrine. Les **triazines** présentent des propriétés herbicides et la consommation de ces composés est passée de 7 990 tonnes en 1985 à 6 005 tonnes en 1990. Semblables aux urées substituées par leur mode d'action et par les quantités mises en jeu, les triazines sont des herbicides puissants qui agissent en inhibant la photosynthèse. Les composés les plus utilisés sont l'atrazine et la simazine en épandage sur les

cultures de maïs. La persistance de ces composés dans le milieu est très variable et les produits de dégradation se révèlent très rémanents puisque la durée de demie-vie de l'atrazine serait supérieure à un an et sous forme adsorbée sur les particules des sols elle atteindrait 9 ans. Les effets inhibiteurs d'une atrazine ont été signalés par Davies et al. (1994) chez la truite contaminée par 2 µg/l de cyanazine et qui présentait une dépression de l'activité AChE du cerveau de 18%. Le **paraquat** est un ammonium quaternaire utilisé comme herbicide car il agit sur les processus de respiration et de photosynthèse de nombreux végétaux notamment les dicotylédones et les graminés. On ne dispose pas de statistiques précises sur l'utilisation de ce produit en France. Selon Nemcsok et al. (1984) le paraquat exercerait des effets inhibiteurs de l'acétylcholinestérase de carpe (*Cyprinus carpio*) à la fois *in vivo* et *in vitro*. Ces poissons exposés à des concentrations en paraquat variables montrent des inhibitions de cholinestérases de l'ordre de 50% dans le cerveau. La CI₅₀ de ce composé vis-à-vis de l'AChE de carpe est estimée par ces auteurs à 3.6 10⁻⁴ M. Szabo et al. (1992) confirment les effets inhibiteurs du paraquat (50% d'inhibition à 5 mg/l) mais précisent que cette période de dépression enzymatique qui dure deux semaines est suivie d'effets activateurs sur l'activité AChE (+ 30% par rapport au contrôle). La nature de ces composés peut tout à fait justifier un effet inhibiteur puisqu'on sait que les ammoniums quaternaires présentent une très grande affinité pour le site anionique des cholinestérases.

2-2. Les anatoxines algales

Plusieurs toxines algales ont été signalées comme étant de puissants inhibiteurs de cholinestérases. Ces anatoxines sont principalement produites par des efflorescences de cyanobactéries des espèces suivantes: *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena flos-aquae* et *Aphanizomenon flos-aquae*. Ces trois espèces sont des organismes d'eau douce et bien qu'elles supportent des eaux saumâtres jusqu'à 8‰ NaCl, elles n'ont jamais été identifiées dans les eaux marines. L'anatoxine a(s) identifiée comme étant un ester de guanidium méthyle phosphate est un agent anticholinestérasique irréversible très puissant mais cette toxine n'est produite que par les cyanobactéries *Anabaena flos-aquae* et par aucune autre espèce connue (Carmichael, 1994). On peut imaginer une diffusion en eau de mer littorale de ces toxines libérées après apparition d'épisodes d'efflorescences phytoplanctoniques de ces espèces en eau douce mais il semble que la stabilité de cette toxine est faible notamment en milieux alcalins tels que l'eau de mer (Carmichael et al., 1993).

2.3. Métaux et métalloïdes

Quelques études ont rapporté les effets inhibiteurs (mais parfois aussi des effets activateurs) de l'activité AChE de muscle ou de cerveau de poisson exposé à des métaux lourds *in vivo* mais les concentrations utilisées dans ces tests sont généralement très éloignées des concentrations mesurées *in situ*.

Comme pour toutes les enzymes, la conformation des cholinestérases est perturbée par la présence de métaux lourds, il n'y a donc pas d'effets spécifiques de ces molécules. La modification conformationnelle de l'AChE par certaines formes organomercuriques a été décrite dans le détail par l'équipe de Sussman et Silman en Israël (Kreimer, 1994).

Les effets *in vitro* de quelques ions métalliques sur l'activité de quatre espèces marines sont données dans le tableau 14. Les extraits sont incubés pendant 40 minutes avec différentes concentrations de métaux solubilisés dans l'eau essentiellement sous la forme de sulfates ou de chlorures.

	Cu							
	CuSO ₄				CuCl ₂	Zn	CdCl ₂	As
	(10 ⁻³)	(10 ⁻⁴)	(10 ⁻⁵)	(10 ⁻⁶)	(10 ⁻⁴ x 0.53)	(10 ⁻⁴)	(10 ⁻³)	(10 ⁻³)
Maquereau								
<i>Scomber scomber</i>	0	5.6	92.5	96	0	83.6	89	67
Plie								
<i>Pleuronectes platessa</i>	0	1.7	92.8	92.3	0	79	88	69
Crevette rose								
<i>Palaemon serratus</i>	0	8.1	87.2	94.6	0	85	89	73
Moule								
<i>Mytilus edulis</i>	0	23.6	90.5	100	0	87	83	68.5

Tableau 14 : Effets de quelques métaux sur l'hydrolyse de l'AcSCH chez quatre espèces marines. Les valeurs sont données en % d'activité résiduelle par rapport au témoin.

L'inhibition 100% est atteinte avec le chlorure de cuivre à $0.53 \cdot 10^{-4}$ M (soit 3.3 mg/l Cu) et avec le sulfate de cuivre à 10^{-3} M (63 mg/l Cu). Des inhibitions importantes sont obtenues après incubation avec le zinc à 10^{-4} M (6.3 mg/l), le chlorure de cadmium à 10^{-3} M (112.4 mg/l Cd) et l'arsenic à 10^{-3} M (75 mg/l).

Ces concentrations sont atteintes voire dépassées dans certains compartiments du milieu marin. Si ces chiffres sont totalement improbables dans la colonne d'eau,

en revanche ils sont égalés dans certains sédiments ou dans la matière vivante mais nous savons que les métaux dans le sédiment sont peu biodisponibles (exceptés le cadmium et le mercure) et qu'une partie du métal est incluse dans la matrice aluminosilicatée du sédiment.

Les données chimiques disponibles sur la Mer du Nord et discutées dans le troisième chapitre font apparaître des teneurs en zinc, cuivre ou arsenic supérieures aux seuils inhibiteurs. La difficulté à interpréter ces données est due aux absences d'informations quant à la spéciation des métaux dans les différents milieux car les indications obtenues *in vitro* à partir de solutions métalliques simples sont peu réalistes. Si ces données nous permettent de considérer en priorité certaines molécules et d'en délaissier d'autres, elles n'ont de valeur écotoxicologique que corrigées par la connaissance des complexations possibles dans l'organisme ou le sédiment. L'exemple est donné par la connaissance des différentes espèces dérivées de l'arsenic dans la matière vivante.

L'arsenic est un métalloïde présent dans le milieu marin sous formes minérales (90%) et sous formes organiques. Les organismes marins peuvent en bioconcentrer des quantités importantes, des roussettes (*Scyliorhinus canicula*) pêchées au Nord-Est du Cotentin ont montré des concentrations en arsenic voisines de 200 mg/kg de poids sec (Cossa et al., 1989) soit $5 \cdot 10^{-4}$ M dans le tissu musculaire. Les concentrations rencontrées chez les poissons plats sont plus faibles d'un facteur 10.

L'arsenic contenu dans ces tissus est sous forme organique, majoritairement sous forme d'arsenobétaïne (95%) (Michel, 1993), dont la toxicité est beaucoup plus faible que celle des formes minérales mais dont les effets inhibiteurs bien que limités restent sensibles à la concentration de $5.8 \cdot 10^{-5}$ M. Les effets inhibiteurs des formes organiques de l'arsenic ont été mesurés, *in vitro*, sur l'AChE de muscle adducteur de moule (tableau 15).

	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁷ M
MMAA	185 ± 12 25 %	210 ± 14 10,3 %	-	262 ± 9,8
DMAA	187 ± 9 24 %	223 ± 6 9,2 %	228 ± 6 7,6 %	251 ± 14 -
ASBET	206 ± 11 16 %	247 ± 5 -	250 ± 8 -	235 ± 5 -
ASCHOL	216 ± 14 12,4 %	245 ± 10 -	253 ± 6 -	252 ± 15 -
TEMOIN	246 ± 11	-	-	-

Tableau 15 : Effets des formes organiques de l'arsenic sur l'activité d'hydrolyse de l'AcSch de muscle adducteur de moule.

MMAA : acide monométhylarsonique ; DMAA : acide diméthylarsinique ; ASBET : arsenobétaïne ; ASCHOL : arsenocholine.

Les activités AChE sont exprimées en nmoles de substrat hydrolysées par minute et par mg de protéine sous forme de moyenne ± E.T. de 4 déterminations. Les inhibitions sont exprimées en pourcentage par rapport à l'activité témoin.

L'acide monométhylarsonique (MMAA) et l'acide diméthylarsinique (DMAA) présentent les effets les plus forts (-25 %) à des concentrations de l'ordre de $7 \cdot 10^{-4}$ M, mais ces produits résultant de biotransformations liées à l'activité phytoplanctonique sont libérés dans le milieu et non accumulables sous ces formes. Les retrouver dans l'environnement à de telles concentrations est improbable. Dans l'exemple de la radiale en Mer du Nord (voir 3-1), l'hypothèse de l'implication des composés arseniés dans l'inhibition des cholinestérases est contredite par la répartition géographique de l'arsenic dans les sédiments de Mer du Nord et surtout par les teneurs en arsenic dans le muscle des limandes puisque les concentrations les plus élevées correspondent aux stations d'activités ChEs les plus fortes.

La toxicité des métaux est strictement liée à leur comportement biogéochimique. Même si la connaissance de la spéciation et de la biodisponibilité des métaux est en essor constant bien des mécanismes intimes tels que le transfert membranaire ou le caractère inerte de certaines formes de stockage dans l'organisme sont loin d'être élucidés.

Les effets de plusieurs métaux considérés comme polluants prioritaires sont largement discutés dans le chapitre suivant consacré à l'étude des effets combinés de mélanges de contaminants.

2-4. Action combinée de mélanges de contaminants sur l'activité AChE de plusieurs espèces marines

Les composés organophosphorés (OP) et les carbamates (C) sont des insecticides puissants qui agissent en inhibant les cholinestérases. La forte toxicité de ces produits justifie l'importance des données sur leurs effets toxiques vis à vis des organismes aquatiques. Ces informations concernent essentiellement la détermination de concentrations létales 50% (CL₅₀ ou LC₅₀) sur de multiples espèces. De nombreuses études d'inhibition des cholinestérases par les OP et C sont aussi disponibles. Au contraire les déterminations de concentrations inhibitrices 50% (CI₅₀ ou IC₅₀) de contaminants autres que les organophosphorés et les carbamates ou de mélanges de contaminants sur l'activité AChE sont rares, exceptés les travaux de Olson and Christensen (1980). Il en découle un manque important d'informations sur les effets toxiques cumulés des mélanges de pesticides et d'autres contaminants. Bien que l'AChE montre une sensibilité spécifique très forte vis à vis des OP et C, la présence de nombreux contaminants organiques et métalliques dans le sédiment marin peut contribuer à renforcer les effets inhibiteurs de ces insecticides. En effet, dans le milieu naturel, les organismes vivants ne sont pas exposés à la présence d'un seul contaminant mais toujours à un mélange plus ou moins complexe de plusieurs d'entre eux. Dès les premiers stades de commercialisation les insecticides sont présentés sous forme de mélanges soit de molécules ayant des effets toxiques différents soit sous forme d'associations de molécules ayant la même cible (Matthiessen et al., 1988). Ainsi les mélanges de plusieurs OP ou d'OP et de carbamates parfois associés à d'autres molécules (métaux, solvants) sont formulés pour quantités de spécialités commerciales (ACTA, 1993). Déjà lors de la dispersion d'un pesticide des produits synergiques sont fréquemment additionnés à la molécule d'origine. Ces produits sont définis comme étant des composés chargés d'augmenter l'effet toxique d'une molécule et ils peuvent agir de différentes manières. Les additifs aux organophosphorés et aux carbamates sont essentiellement des inhibiteurs des systèmes de détoxification (Bernard et Phylogène, 1993) qui amplifient considérablement les effets inhibiteurs sur les cholinestérases *in vivo*.

Dans le réceptacle terminal que représente le milieu marin, la présence simultanée d'une multitude de xénobiotiques a été souvent démontrée

particulièrement dans le sédiment. Les effets combinés de ces contaminants ont été décrits comme étant "plus ou moins forts" que la simple addition des effets ou sans interaction entre eux, cette situation déjà confuse est rendue encore plus complexe par le fait que certains de ces composés ne sont pas intrinsèquement néfastes mais que leur présence peut renforcer les effets de molécules toxiques. La contribution de chacun de ces composés à un effet toxique global est difficile à préciser. Enfin des problèmes de terminologie se sont posés puisque les mêmes termes (synergie, potentiation) ont été utilisés pour décrire des situations différentes ou des situations semblables par des termes différents ou encore des expressions sujettes à confusion telles que "plus qu'additif" ou "moins qu'additif" (Murty, 1986).

Le but de cette étude est double:

- -déterminer la valeur de la CI_{50} (concentration en contaminant entraînant une inhibition de 50% de l'activité acétylcholinestérasique) de 9 pesticides (7 insecticides, 2 herbicides) et de 6 métaux ou composés organométalliques sous leur forme majoritaire dans le sédiment ou pour certains sous leur forme organique bioaccumulée.
- -déterminer la nature des effets combinés de mélange de contaminants sur l'activité AChE en recherchant d'éventuels effets de renforcement des effets inhibiteurs des OP et C.

Les études ont été menées sur 4 espèces marines dans le but d'identifier l'espèce présentant la plus grande sensibilité aux contaminants.

2-4-1. Matériels et méthodes

2-4-1-1. Extraits enzymatiques

Les extraits ont été réalisés à partir du muscle dorsal de dragonnet (*Callionymus lyra*), de sole (*Solea solea*), du muscle abdominal de crevette rose (*Palaemon serratus*) et de tissu branchial d'huitre (*Crassostrea gigas*). Les dragonnets et les soles sont pêchés durant une campagne scientifique. Les crevettes et les huitres sont obtenues vivantes chez des producteurs locaux.

Les tissus sont prélevés sur les animaux vivants et homogénéisés (dans un rapport 1/2, poids/volume) dans du 0.1 M TRIS-HCl pH 7.8. Les extraits sont centrifugés à 10 000 g pendant 30 minutes à 4°C. Les surnageants bruts sont utilisés comme source enzymatique.

2-4-1-2-. Les contaminants testés

⇒ Les pesticides testés sont les suivants :

- 3 composés organophosphorés : le dichlorvos ou DDVP, utilisé dans le traitement des épidémies de puce (copépode, *Lepeophtheirus salmonis*) du saumon dans les stations aquacoles et rejeté dans l'environnement, le fénitrothion, encore épandu massivement dans la démoustiquation et la phosalone sur les cultures.
- 2 carbamates : le carbaryl et le carbofuran utilisés tous deux en agriculture sur les champs de maïs.
- 2 composés organochlorés : le DDT et le lindane (hexachlorocyclohexane). Malgré l'interdiction d'usage en France, le DDT persiste dans l'environnement. Le lindane est encore largement utilisé.
- 1 triazine, l'atrazine est un herbicide.
- 1 urée substituée, l'isoproturon est aussi un herbicide.

Tous les composés sont dissous dans l'éthanol, exceptés les organochlorés (DDT, lindane) qui sont dissous dans l'acétone. Le lindane provient de chez SIGMA Chemical, le carbaryl et la phosalone proviennent de chez RHONE-POULENC, l'isoproturon, le fenitrothion, le dichlorvos, l'atrazine et le carbofuran proviennent de l'Institute of Organic Industrial Chemistry, Varsovie, Pologne. Tous ces réactifs sont de qualité analytique.

⇒ Les composés métalliques ou organométalliques suivants:

Les produits suivants ont été testés : le chlorure de zinc ($ZnCl_2$), le chlorure de cadmium ($CdCl_2$), le chlorure mercurique ($HgCl_2$), le chlorure de méthylmercure ($(CH_3Hg)Cl$), le chlorure de tributylétain [$(C_4H_9)_3SnCl$] et le trioxyde d'arsenite (As_2O_3). Ces composés sont dissous dans de l'eau distillée excepté le méthylmercure qui est dissous dans l'éthanol. Ils proviennent tous de chez SIGMA Chemical et MERCK. Le chlorure de méthylmercure nous est procuré par D.Cossa, IFREMER.

Excepté le méthylmercure qui est la forme organique majoritaire bioaccumulée du mercure, les autres métaux sont, sous forme de chlorures, des contaminants importants du sédiment littoral ou estuarien (R.N.O.,1995).

2-4-1-3. Méthode de détermination de la CI_{50}

Dans un premier temps les CI_{50} des inhibiteurs organophosphorés et carbamates ont été déterminées. Puis les CI_{50} des autres molécules ont été recherchées. Dans les études des effets des mélanges, les produits ont toujours été testés 2 par 2 en incluant systématiquement au moins un OP ou un C.

Des gammes de concentrations de 10^{-4} à 10^{-10} M en OP et C ont été testées, les effets des autres pesticides ont été mesurés aux concentrations suivantes 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 et 1000 $\mu\text{g/l}$. Le DDT a été testé jusqu'à 10 mg/l. Les composés métalliques et organométalliques ont été testés à 0.001, 0.01, 0.1, 1 et 10 mg/l. Les concentrations supérieures à ces valeurs, improbables dans le milieu naturel, ont été écartées.

Les mesures de l'activité AChE ont été réalisées à partir de la méthode colorimétrique d'Ellman transposée à l'usage d'un lecteur de microplaque en utilisant l'acétylthiocholine comme substrat à température contrôlée de 20°C. L'extrait enzymatique est incubé pendant 60 minutes avec différentes concentrations d'un même volume (10 μl éthanol ou acétone par puits) des différents polluants. La cinétique enzymatique est suivie après addition du réactif DTNB et du substrat AcSCh en mesurant la variation de densité optique pendant trois minutes. Quatre cinétiques (4 puits) sont suivies simultanément pour chaque concentration testée. Dans tous les cas les données sont pondérées par les mesures des effets des contaminants, de l'éthanol et de l'acétone sur le réactif DTNB et sur le substrat AcSCh.

Un logiciel de détermination de CI_{50} développé au laboratoire permet le pilotage du lecteur de microplaque, la saisie des données et le calcul de la CI_{50} (Galgani et al., 1992b). L'activité AChE moyenne est calculée pour chacune des concentrations en toxique et ces valeurs sont comparées à l'activité moyenne des extraits sans toxique (100% activité). Les valeurs ne présentant pas de différence significative par rapport au témoin sont éliminées du mode de calcul du logiciel. L'estimation de la CI_{50} est obtenue en calcul itératif par approximations successives. Ce mode de calcul permet une estimation fine de la CI_{50} après régression asymptotique de la courbe d'inhibition en fonction des concentrations en polluants (figure 14 et 15).

2-4-1-4. Méthode de détermination des effets d'un mélange

Dans les cas d'études des effets combinés inhibiteur/contaminant les résultats sont discutés en terme de potentialisation ou renforcement des effets inhibiteurs des OP et C.

Le schéma de Gaddum (1948) modifié par Sprague (1970) est utilisé pour interpréter les interactions entre inhibiteurs. Comme il y a risque de confusion dans la terminologie des effets de combinaisons de polluants qui agissent simultanément il est nécessaire de définir chacun des qualificatifs applicables à ce type d'effets:

Date 171193
 Manipulateur
 Produit, no du lot phocal
 seuil H,B,coef,unit *****
 Type cell., dure
 Longueur ondes 405

nombre de mesures : 24

CI50 : 6.863 <= 8.851 <= 10.839

Y0 176.124 alpha 0.652 beta 8.851

*	*	*	*	*	*	0.165	0.149	0.109	0.073	0.044	0.041
*	*	*	*	*	*	0.181	0.148	0.105	0.068	0.044	0.035
*	*	*	*	*	*	0.176	0.150	0.114	0.077	0.043	0.037
*	*	*	*	*	*	0.172	0.145	0.102	0.073	0.043	0.039
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

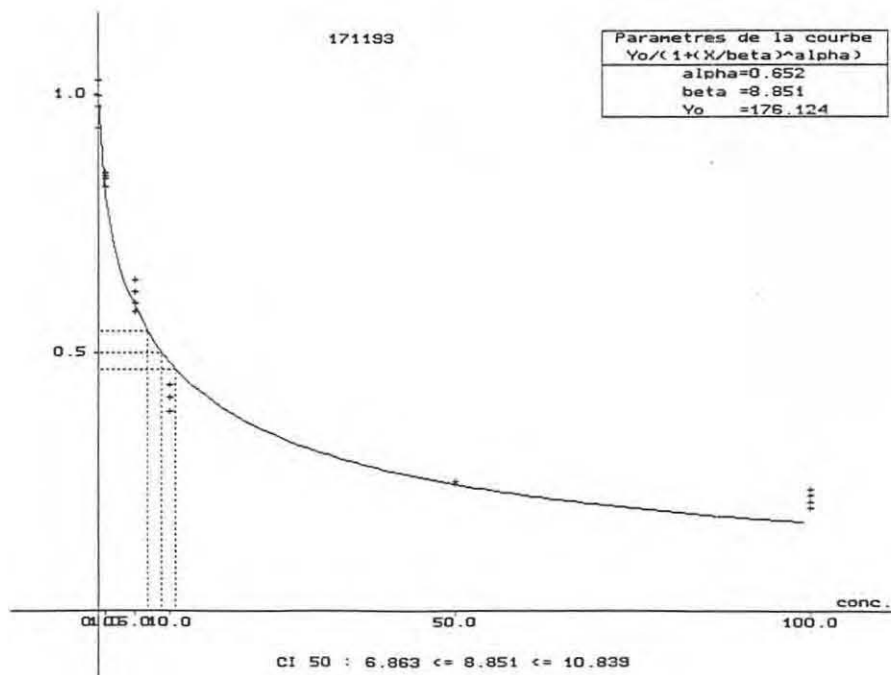


Figure 14 : Exemple de détermination d'une CI50 à partir de la lecture d'une plaque à microtitration grâce au logiciel de calcul itératif.

Détermination de la CI50 de la phosalone vis-à-vis de l'extrait musculaire brut de callionyme.

Date 221193
 Manipulateur
 Produit, no du lot mel op/c
 seuil H,B,coef,unit *****
 Type cell., dure
 Longueur ondes 414

nombre de mesures : 96

CI50 : 0.205 <= 0.219 <= 0.232

Y0 400.060 alpha 1.781 beta 0.219

*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
0.403	0.208	0.106	0.022	0.017	0.019	*	*	*	*	*	*
0.399	0.226	0.100	0.019	0.017	0.015	*	*	*	*	*	*
0.430	0.217	0.102	0.019	0.014	0.014	*	*	*	*	*	*
0.368	0.214	0.100	0.021	0.011	0.010	*	*	*	*	*	*

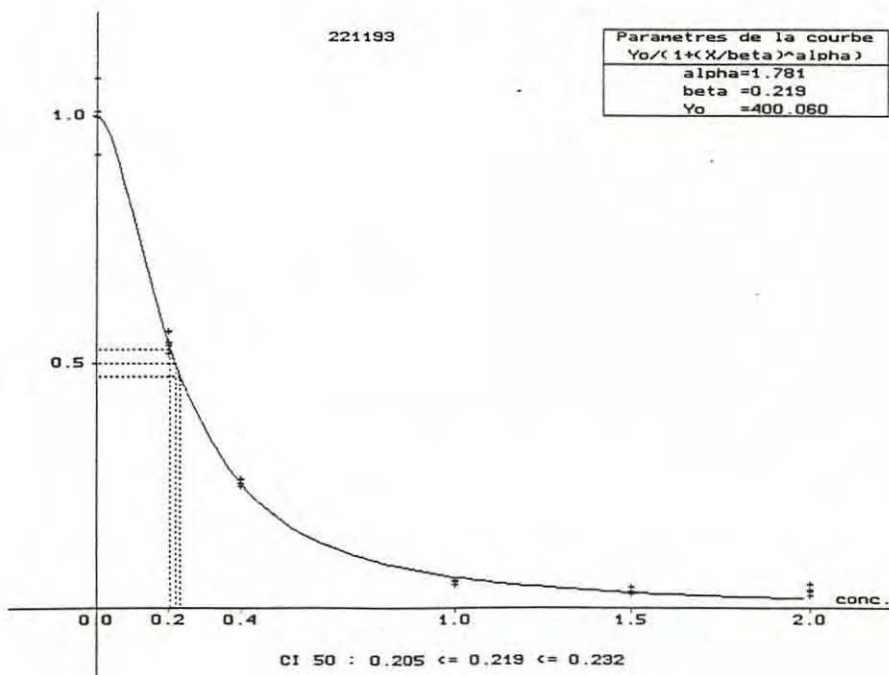


Figure 15 : Exemple de détermination des effets combinés de deux inhibiteurs à partir de la lecture d'une microplaque et grâce au logiciel de calcul itératif. Détermination des effets de l'association du carbofuran et de la phosalone sur un extrait musculaire de sole.

- le terme "effets additifs" tel qu'il est employé ici signifie que l'effet de la combinaison de deux toxiques résulte de l'addition simple des effets de chacun des produits pris séparément.
- le terme "effets synergiques" indique que l'effet du mélange de deux substances est supérieur à la simple addition des effets de chacun des toxiques.
- le terme "potentiation" est un terme strictement anglosaxon dont la traduction se rapprocherait "d'effets renforçateurs". Il est réservé à la capacité de certaines molécules d'augmenter les effets d'un inhibiteur de manière significative sans que ces produits soient eux-mêmes inhibiteurs.

Le diagramme décrit par Gaddum (fig. 16), représente les effets de la combinaison de deux produits toxiques dont les axes sont soit directement des concentrations en toxique ou des unités de toxicité (Toxic Unit) propre à chacune des molécules testées. Dans cette étude une unité toxique (T.U.) équivaut à la valeur de la CI_{50} d'un inhibiteur donné (OP ou C).

La nature de l'effet conjugué de deux inhibiteurs est déterminée par l'équation suivante:

$$x TU_A + y TU_B = 1 TU (A+B)$$

où:

⇒TU est l'unité toxique (CI_{50})

⇒A et B sont les inhibiteurs de cholinestérases : organophosphate, carbamate ou autre molécule inhibitrice.

⇒x et y sont les proportions de chacune des TU de A et B présents dans le mélange (par exemple 0.5 A + 0.5 B, dans cette hypothèse $x = 0.5$ et $y = 0.5$)

Si :

⇒ $x + y = 1$ l'effet conjugué est additif.

⇒ $x + y < 1$ l'effet conjugué est synergique et plus la valeur de $x + y$ est faible et plus la synergie est forte.

⇒ $x + y > 1$ l'effet conjugué est antagoniste.

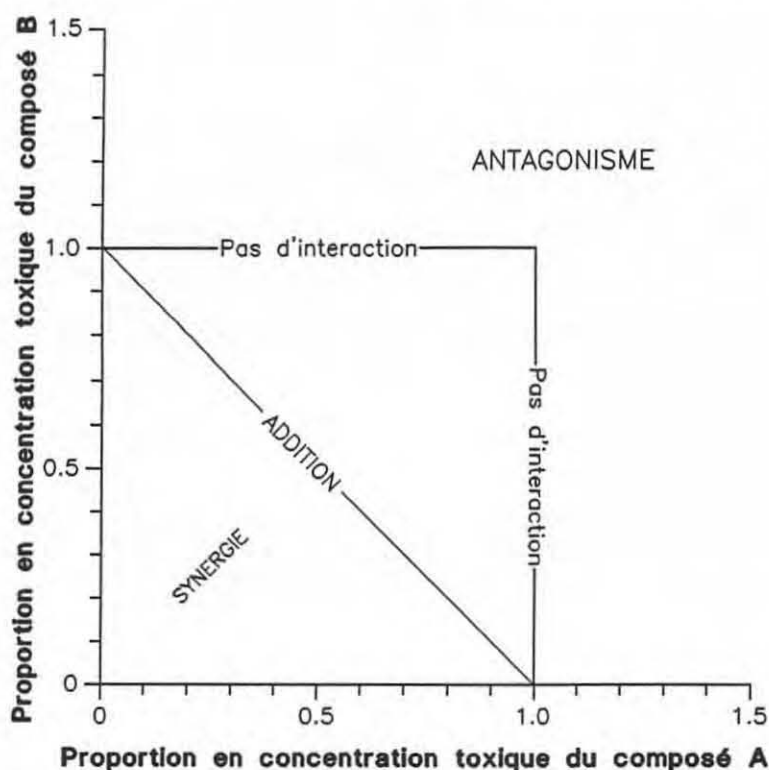


Fig. 16. Représentation graphique selon Gaddum de la nature des effets combinés de deux toxiques.

Si une unité d'un produit A ou B est nécessaire à l'inhibition de 50% de l'activité AChE d'un extrait et si la même réponse est obtenue par la combinaison de A et B à des proportions qui se situent dans la moitié gauche du carré (par exemple 0.3 A + 0.3 B) l'effet est synergique. Si $x + y = 1$ l'action conjuguée des deux composés est seulement additive. Si une unité toxique est nécessaire à l'obtention de la CI_{50} quelque soit la proportion du second produit il n'y a pas d'interaction. Enfin si plus d'une unité toxique d'un produit est nécessaire à cause de la présence du second l'effet combiné est dit antagoniste.

Les différents extraits enzymatiques ont été incubés avec des proportions variables de CI_{50} d'inhibiteurs (0.1 A + 0.1 B, 0.2 A + 0.2 B, 0.5 A + 0.5 B etc...) puis la détermination d'une nouvelle CI_{50} est calculée comme décrit précédemment (voir figure 15).

Dans le cas particulier où aucun effet inhibiteur n'a pu être déterminé pour des molécules contaminantes seules (hors OP et C), la nature des effets combinés en présence d'un organophosphoré ou d'un carbamate est appréhendée différemment et les extraits sont incubés avec différentes concentrations en inhibiteur mais une concentration constante en contaminant. Dans ces conditions une nouvelle CI_{50} est déterminée et comparée à la CI_{50} originale de l'inhibiteur.

2-4-2. Résultats et discussion

2-4-2-1. Détermination de la CI_{50} de plusieurs organophosphores et carbamates.

2-4-2-1-1. Influence de la durée de l'incubation sur la détermination de la CI_{50} .

L'intensité des effets inhibiteurs des organophosphorés ou des carbamates en fonction de la durée d'exposition de l'enzyme à l'inhibiteur a été suivie pour chacun des produits. Les effets du carbaryl et du carbofuran sont à leur niveau maximal après 30 minutes d'exposition alors que les incubations avec les OP, notamment la phosalone, montrent une progression des effets liés à la durée de l'incubation.

La figure 17 représente le suivi de la CI_{50} de la phosalone sur l'AChE de dragonnet en fonction de divers temps de préincubation.

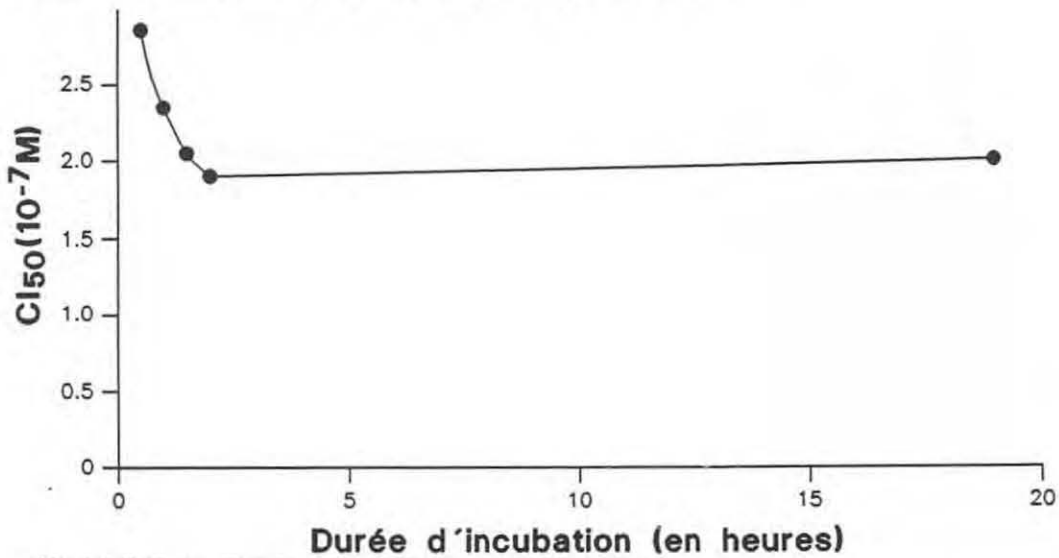


Figure 17 : Détermination de la CI_{50} de la phosalone sur l'AChE de callionyme en fonction de la durée de l'incubation inhibiteur/AChE.

L'évolution de la CI_{50} est étroitement fonction de la durée de l'incubation enzyme /inhibiteur. Ainsi la valeur de la CI_{50} de la phosalone vis à vis de l'AChE de callionyme passe de $9.1 \cdot 10^{-7} M$ après 30 mn d'exposition à $2.8 \cdot 10^{-7} M$ après 90 mn. Les mesures prises après 2 puis 19 heures d'incubation montrent une stabilisation de la CI_{50} à 1.9 et $2.0 \cdot 10^{-7} M$. Les essais réalisés avec les autres organophosphorés montrent le même profil quelque soit l'espèce mais l'inhibition est maximale entre 30 et 60 minutes selon les inhibiteurs ou les espèces. Ces résultats montrent l'importance de cette notion de durée d'exposition aux inhibiteurs particulièrement dans des milieux complexes tels que les extraits enzymatiques bruts où le polymorphisme des cholinestérases est important et où

certaines mécanismes, notamment certains processus d'activation des inhibiteurs sont encore possibles.

Le tableau 16 donne les valeurs de CI_{50} calculées pour les OP et C vis à vis des 4 extraits enzymatiques après 60 minutes d'incubation:

	Callionyme	Sole	Crevette rose	Huître
Carbaryl	3.0×10^{-7} $\pm 0.7 \times 10^{-7}$ (6)	7.8×10^{-6} $\pm 0.3 \times 10^{-6}$ (3)	1.7×10^{-7} $\pm 0.6 \times 10^{-7}$ (4)	1.5×10^{-7} $\pm 0.5 \times 10^{-7}$ (5)
Carbofuran	2.8×10^{-8} $\pm 0.7 \times 10^{-8}$ (7)	8.0×10^{-7} $\pm 0.5 \times 10^{-7}$ (3)	1.1×10^{-8} $\pm 0.3 \times 10^{-8}$ (5)	1.5×10^{-8} $\pm 0.5 \times 10^{-8}$ (5)
Dichlorvos	2.3×10^{-8} $\pm 0.4 \times 10^{-8}$ (5)	3.1×10^{-7} $\pm 0.8 \times 10^{-7}$ (6)	1.1×10^{-6} $\pm 0.2 \times 10^{-6}$ (5)	7.3×10^{-8} $\pm 1.0 \times 10^{-8}$ (6)
Fénitrothion	2.6×10^{-5} $\pm 0.5 \times 10^{-5}$ (4)	1.2×10^{-4} $\pm 0.3 \times 10^{-4}$ (5)	$> 10^{-4}$	1.4×10^{-4} $\pm 0.2 \times 10^{-4}$ (5)
Phosalone	6.2×10^{-7} $\pm 1.5 \times 10^{-7}$ (5)	2.5×10^{-6} $\pm 0.7 \times 10^{-6}$ (4)	$> 10^{-4}$	$> 5 \times 10^{-4}$

Tableau 16: Détermination de la CI_{50} de cinq insecticides sur l'activité d'hydrolyse de l'AcSCh de quatre espèces marines

L'incubation entre l'enzyme et l'inhibiteur est de 60 minutes.

Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de réplicats par détermination.

La CI_{50} est exprimée en concentration molaire, l'écart-type est calculé sur un nombre variable de répliquats.

Le dichlorvos, le carbaryl et le carbofuran montrent un pouvoir inhibiteur extrêmement élevé sur les 4 espèces, ainsi la CI_{50} du carbofuran atteint 1.1×10^{-8} M sur l'extrait de crevette rose qui montre la plus grande sensibilité aux carbamates. Cette sensibilité particulière des crustacés a déjà été relevée par plusieurs auteurs qui démontrent la plus grande sensibilité des crustacés aux carbamates plutôt qu'aux organophosphorés (Habig et al., 1988. Burrige et Haya, 1988. Bocquené et Galgani, 1991).

Olson et Christensen (1980) qui travaillent sur un extrait de poisson d'eau douce, le vairon (*Pimephales promelas*) rapportent des CI_{50} de l'ordre de 10^{-5} M avec le carbaryl, tandis que le callionyme (*C. lyra*) présente une sensibilité beaucoup plus forte (3.0×10^{-7} M). Comparée à la sole (*Solea solea*), cette espèce se révèle extrêmement sensible vis à vis à la fois du carbofuran et du dichlorvos (2.8×10^{-8} M et 2.3×10^{-8} M).

Bien que les mollusques soient moins sensibles aux OP et C que les crustacés et les vertébrés (Galgani et Bocquené, 1990), comparée à l'activité AChE de l'animal entier, la branchie d'huitre offre une bonne sensibilité. Compte tenu de la connaissance du polymorphisme des cholinestérases de la branchie d'huitre (voir 1-4-2-3), il apparaît que la forme membranaire sensible est bien la forme majoritaire dans la branchie d'huitre ($\cong 80\%$ de l'activité cholinestérasique totale). Le fénitrothion et la phosalone montrent un pouvoir inhibiteur nettement moins élevé, particulièrement la phosalone vis à vis des invertébrés ($>10^{-4}$ M). Cette différence entre le pouvoir inhibiteur élevé du dichlorvos et le faible pouvoir du fénitrothion et de la phosalone est probablement due à la nature du groupe lié au phosphore. Le fénitrothion et la phosalone possèdent la forme thion (=S) alors que le dichlorvos a déjà la forme active oxon (=O). Les organophosphorés de type thio ne sont pas d'emblée de puissants inhibiteurs de cholinestérases et ils nécessitent une étape d'activation pour devenir inhibiteurs (Eto, 1974. Klaverkamp et Hobden, 1980). Cette activation apparaît principalement à travers l'action des systèmes enzymatiques à fonctions oxydases multiples (MFO) responsables de la désulfuration oxydative de la molécule comprenant le groupement souffré. Au contraire, le dichlorvos est directement disponible sous la forme oxon et ne nécessite pas d'activation préalable à l'efficacité de son pouvoir inhibiteur. L'explication la plus probable de l'augmentation de l'effet toxique de la phosalone en fonction du temps (fig.17) est que l'oxydation de cet organophosphoré se fait lentement dans le puits pendant la phase d'incubation, peut-être sous l'effet d'enzymes de biotransformation présents dans l'extrait mais aussi de paramètres physicochimiques tels que la lumière.

2-4-2-2. Etude des effets inhibiteurs de quelques contaminants majeurs du milieu marin

Les autres pesticides DDT, lindane, atrazine et isoproturon ne sont pas des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase des 4 espèces choisies aux concentrations maximales testées. Parmi les métaux, aucun effet inhibiteur n'est observé avec les chlorures de zinc, cadmium et tributylétain ou de méthylmercure, même à 10mg/l. Le chlorure mercurique montre une action inhibitrice sur l'huitre avec une CI_{50} de 6 mg/l soit $2.2 \cdot 10^{-5}$ M. Le trioxyde d'arsenite inhibe l'AChE de la crevette rose et de la sole à des CI_{50} respectives de 4.7 mg/l ($2.4 \cdot 10^{-5}$ M) et 8.8 mg/l ($4.4 \cdot 10^{-5}$ M) ainsi que l'AChE de callionyme à 10.7 mg/l ($5.4 \cdot 10^{-5}$ M).

Ces résultats sont similaires à ceux publiés par Olson et Christensen (1980) qui ont montré que l'incubation d'un extrait musculaire de vairon à $3.2 \cdot 10^{-5}$ M d'arsenite réduisait de moitié l'activité AChE de cette espèce. Selon ces auteurs aucun effet inhibiteur n'est observé avec les pesticides organochlorés tels que le

DDT et le lindane. Le chlorure de zinc n'affecte pas non plus l'activité AChE chez les espèces étudiées ce qui semble en accord avec les résultats publiés par Nemcsok et al. (1984). Par contre notre étude ne montre pas d'effet du chlorure de cadmium alors que Olson et Christensen fixent la CI_{50} de l'ion Cd^{++} à $5.7 \cdot 10^{-4}$ M et Gill et al. (1991) décrivent une inhibition de l'acétylcholinestérase de branchie chez le poisson barbot (*Barbus conchoni*) mais une activation de cette enzyme dans le muscle. Aux concentrations utilisées par Olson et Christensen aucun effet n'est mesurable chez les espèces marines étudiées ici. Dans l'étude d'Olson et Christensen, la CI_{50} du méthylmercure est estimée à $5 \cdot 10^{-3}$ M correspondant à 1.4 g/l; cette concentration n'a pas été testée dans cette étude car selon Cossa et al. (1989), elle n'est pas compatible avec celle trouvée dans les foies de poisson où la teneur est généralement inférieure à 10^{-5} M.

2-4-2-3. Toxicité conjuguée des mélanges d'organophosphorés et de carbamates

2-4-2-3-1. Influence de la durée d'incubation sur les effets inhibiteurs de mélanges d'OPs et Cs

La figure 18 montre les différentes valeurs (en Unité Toxique T.U.) de la toxicité d'un mélange de carbaryl + phosalone sur un extrait de callionyme en fonction de différents temps d'exposition. Si l'effet de ce mélange est simplement additif après 30 mn d'incubation (1.1 T.U.), il devient rapidement synergique après 60 mn (0.75 T.U.) et continue d'évoluer pendant les heures suivantes. Après 5 heures d'exposition l'effet inhibiteur conjugué du mélange est fortement synergique (0.33 T.U.) et se stabilise à cette valeur pour des temps d'incubation plus longs.

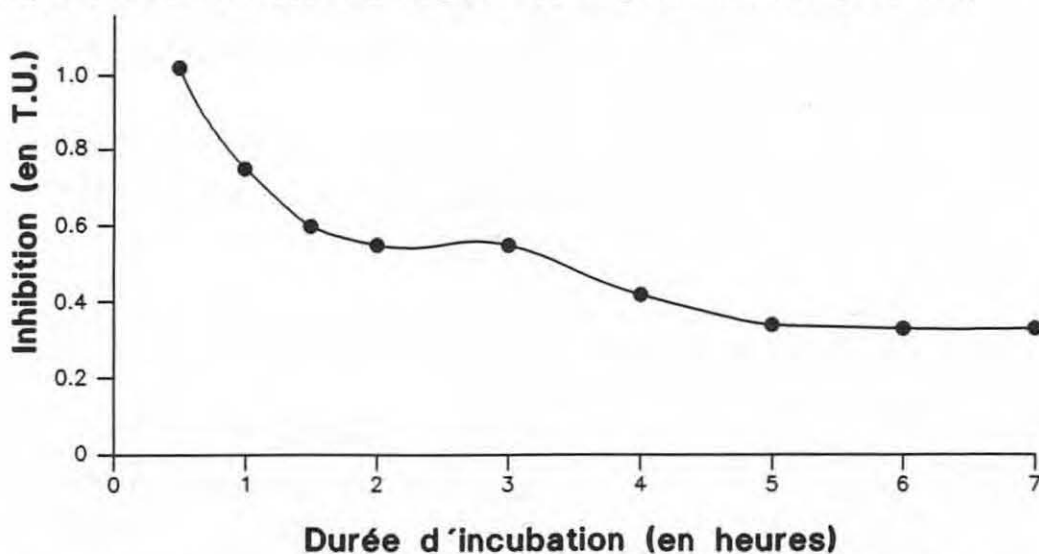


Figure 18 : Détermination de la nature des effets d'un mélange d'inhibiteurs en fonction de la durée de l'incubation. Effets d'un mélange carbaryl + phosalone sur l'AChE de callionyme

Le tableau 17 montre que ces informations sont semblables pour de nombreuses combinaisons sur différents extraits.

A la différence des incubations impliquant un seul inhibiteur où l'intensité des effets est maximale après 60 minutes (excepté le cas de la phosalone où l'inhibition est maximale après 120 minutes d'exposition), les effets d'une exposition à un mélange augmentent pendant plus longtemps. Ainsi les effets de la combinaison du dichlorvos et du carbofuran sur l'AChE de crevette continuent d'augmenter à 180 mn et à 300 mn d'incubation passant de 0.34 T.U. (60 mn) à 0.19 T.U. (180mn) et à 0.10 T.U. (300 mn).

	60 minutes d'incubation	180 minutes d'incubation	300 minutes d'incubation
Phosalone + fénitrothion AChE de callionyme	1.10 ± 0.27	0.47 ± 0.13	-
Dichlorvos + carbofuran AChE de crevette rose	0.34 ± 0.08	0.19 ± 0.07	0.10 ± 0.03
Phosalone + carbofuran AChE de callionyme	0.30 ± 0.08	0.15 ± 0.03	-
Fénitrothion + carbofuran AChE de callionyme	0.28 ± 0.08	0.13 ± 0.05	-
Carbofuran + carbaryl AChE de sole	0.74 ± 0.09	0.41 ± 0.09	-

Tableau 17 : Effets de la durée d'incubation sur la toxicité conjuguée de différentes associations d'insecticides sur l'hydrolyse de l'AcSCh chez trois espèces marines.

Les résultats sont exprimés en Unité Toxique (T.U.) ± E.T. de quatre déterminations. Plus la valeur de T.U. est faible, plus l'effet synergique est fort. (voir 2-4-1-4. pour des explications détaillées).

2-4-2-3-2. Effets inhibiteurs des mélanges d'organophosphorés et de carbamates.

Les résultats sont regroupés dans le tableau 17.

Les mélanges d'inhibiteurs testés, OP et/ou C, présentent tous des effets synergiques très importants. Seuls les effets du mélange phosalone/fénitrothion ne sont qu'additifs après 60 mn d'incubation (le tableau 17 montre que l'exposition à ce mélange pendant 180 mn présente les caractéristiques d'un effet synergique).

	Carbofuran	Dichlorvos	Fénitrothion	Phosalone
Carbaryl				
Dragonet	0.72 ± 0.06	0.50 ± 0.04	0.58 ± 0.05	0.75 ± 0.02
Sole	0.74 ± 0.06	0.38 ± 0.03	0.36 ± 0.02	0.20 ± 0.01
Crevette rose	0.76 ± 0.07	0.70 ± 0.05	nd	nd
Huître	0.72 ± 0.05	0.72 ± 0.05	0.56 ± 0.04	nd
Dichlorvos				
Dragonet	0.42 ± 0.03	-	-	-
Sole	0.24 ± 0.01	-	-	-
Crevette rose	0.34 ± 0.03	-	-	-
Huître	0.76 ± 0.08	-	-	-
Fénitrothion				
Dragonet	0.28 ± 0.02	0.66 ± 0.06	-	-
Sole	0.45 ± 0.03	0.54 ± 0.03	-	-
Crevette rose	nd	nd	-	-
Huître	0.45 ± 0.04	0.68 ± 0.06	-	-
Phosalone				
Dragonet	0.30 ± 0.02	0.20 ± 0.01	1.10 ± 0.09	-
Sole	0.22 ± 0.01	0.58 ± 0.03	0.25 ± 0.02	-
Crevette rose	nd	nd	nd	-
Huître	nd	nd	nd	-

Tableau 18: Effets combinés de mélanges d'organophosphoré et de carbamate sur l'hydrolyse de l'AcSCh chez 4 espèces marines.

Les résultats sont donnés en Unité Toxique ± E.T. de 4 déterminations, nd = valeur non déterminable. Plus la valeur de T.U. est faible plus la synergie des effets est forte (voir 2-4-1-4 pour des explications détaillées).

La combinaison carbofuran/carbaryl montre les effets synergiques les moins prononcés sur l'ensemble des quatre espèces. De manière générale les combinaisons organophosphate/carbamate exercent les effets synergiques les plus élevés, les mélanges OP/OP ou C/C se révélant moins inhibiteurs. Ainsi les valeurs les plus faibles qui expriment les plus fortes synergies sont rencontrées avec les mélanges carbaryl/phosalone (0.20 T.U. chez la sole), dichlorvos/carbofuran (0.24 T.U. chez la sole) et phosalone /carbofuran (0.22 T.U. chez la sole). Parmi les quatre espèces testées, les deux poissons sole et callionyme présentent la plus grande sensibilité aux effets combinés des

inhibiteurs, l'huitre étant la moins sensible de ces espèces. Il faut noter l'importance des effets synergiques obtenus. Chez le callionyme et chez la sole, dans de nombreux cas d'associations OP/C la diminution de 50% de l'activité AChE des extraits est obtenue avec seulement 0.1 CI₅₀ des deux inhibiteurs entrant dans la combinaison, malgré un temps d'incubation court (60 mn).

Les déterminations de toxicité aigüe des organophosphorés et des carbamates sont largement disponibles pour la majorité des produits. Il s'agit généralement de calcul de concentrations létales 50% (LC₅₀) in vitro.

Les travaux sur les effets de mélanges sont rares et les données sont quasiment inexistantes. Selon les sources WHO/IPCS (1986) compte tenu de la manière dont s'exerce l'effet toxique des OPs et C, l'exposition à plus d'un inhibiteur doit engendrer au minimum des effets additifs. En réalité les quelques travaux disponibles sur ce sujet, et notamment les synthèses de Eto (1974) montrent que l'association de plusieurs de ces inhibiteurs est de type synergique.

Chevreuil (1978) expose la perche soleil (*Lepomis machrochirus*) à différents mélanges d'inhibiteur et conclue à l'effet synergique dans les cas d'exposition aux combinaisons parathion/diazinon, malathion/paraoxon et malathion/carbaryl et à un effet additif seulement dans le cas du mélange carbaryl/méthylazinphos.

Gupta (1994) dans sa synthèse sur le carbofuran précise que l'association de ce dernier avec d'autres inhibiteurs de cholinestérases peut aboutir à un effet inhibiteur synergique.

2-4-2-4. Toxicité conjuguée de mélanges inhibiteur/contaminant

Parmi les contaminants organiques, les pesticides atrazine (0.003 mg/l), isoproturon (0.01 mg/l), DDT (1mg/l) et lindane (0.1mg/l) ne renforcent pas les effets inhibiteurs des OP et C.

Parmi les contaminants d'origine métallique, seuls les chlorures de zinc (10mg/l) et de cadmium (0.1mg/l) associés au dichlorvos et à la phosalone montrent un effet inhibiteur amplifié sur l'AChE de callionyme (tableau 19) et seulement sur cette espèce.

	ZnCl ₂	CdCl ₂
Carbaryl	ns	ns
Carbofuran	ns	ns
Dichlorvos	0.64	0.78
Fénitrothion	ns	ns
Phosalone	0.61	0.67

Tableau 19 : Effets du chlorure de zinc (10mg/l) et du chlorure de cadmium (0.1 mg/l) sur le pouvoir inhibiteur de 5 insecticides vis-à-vis de l'hydrolyse de l'AcSCh chez le callionyme.

Les résultats sont exprimés en rapport CI_{50c}/CI_{50o} où CI_{50o} est la CI_{50} originale du dichlorvos ou de la phosalone et CI_{50c} est la nouvelle CI_{50} calculée en présence de ZnCl₂ ou CdCl₂. Ce rapport n'est calculé que dans les cas où CI_{50c} et CI_{50o} sont significativement différentes ($p < 0.05$ au test de Student).

ns = CI_{50c} et CI_{50o} ne sont pas significativement différentes.

Les associations de ces chlorures avec le carbaryl, le carbofuran et le fénitrothion n'entraînent aucun effet additif sur aucune autre espèce testée. Cette sensibilité particulière du callionyme reste inexpiquée.

Des effets inhibiteurs renforcés sont mis en évidence par la présence de trioxyde d'arsenite notamment dans les associations carbofuran/arsenite chez la sole (0.23 T.U.), dichlorvos/arsenite chez la sole (0.28 T.U.) et le callionyme (0.20 T.U.) et phosalone/arsenite chez le callionyme (0.23 T.U.). Le tableau 20 montre que toutes les combinaisons organophosphoré/arsenite et carbamate/arsenite présentent des effets renforcés. Cette fois encore les extraits de poissons sont les plus sensibles aux effets combinés.

Lee et Scott (1989) signalent le renforcement des effets inhibiteurs de l'association du carbamate fénoxycarbe avec le vectobac (*Bacillus thuringiensis*) sur l'AChE du poisson *Fundulus heteroclitus*, ces deux composés étant utilisés en association dans la destruction des larves de moustique.

Carbaryl	
Callionymus	0.47 ± 0.04
Sole	0.34 ± 0.04
Crevette rose	0.44 ± 0.05
Huître	nd
Carbofuran	
Callionymus	0.36 ± 0.03
Sole	0.23 ± 0.01
Crevette rose	0.43 ± 0.04
Huître	nd
Dichlorvos	
Dragonet	0.20 ± 0.01
Sole	0.28 ± 0.02
Crevette rose	0.51 ± 0.03
Huître	nd
Fénitrothion	
Dragonet	0.35 ± 0.03
Sole	0.30 ± 0.02
Crevette rose	nd
Huître	nd
Phosalone	
Dragonet	0.23 ± 0.01
Sole	0.39 ± 0.03
Crevette rose	nd
Huître	nd

Tableau 20 : Effets combinés de mélanges de trioxyde d'arsenite et d'organophosphoré et carbamate sur l'hydrolyse de l'AcSCh chez quatre espèces marines.

Les résultats sont donnés en Unité Toxique ± E.T.de 4 déterminations, nd = valeur non déterminable. Plus la valeur de T.U.est faible plus la synergie des effets est forte.Voir 2-4-1-4 pour des explications détaillées.

La teneur en arsenic total mesuré dans le sédiment marin varie entre 5 et 20 mg/kg mais peut atteindre 100mg/kg (Michel, 1993). Dans les systèmes aquatiques oxygénés l'arsenic se présente essentiellement sous forme d'ions arsenate et arsenite (forme réduite), cette dernière est trouvée majoritairement

dans l'eau et les sédiments quand l'activité biologique est importante (Michel et al, 1992). Les organismes marins peuvent en bioaccumuler des concentrations importantes qui peuvent atteindre $5 \cdot 10^{-4}$ M dans le muscle de roussettes (*Scyliorhinus canicula*) capturées en Manche (Cossa et al, 1989). Les formes organiques accumulées de l'arsenic sont essentiellement les formes arsenobétaine et arsenocholine. Il paraît évident que de nombreux autres paramètres influent sur la toxicité des inhibiteurs, on sait notamment que le taux d'oxygène dissous est un facteur agissant. Høy et al.(1991) montrent que l'inhibition d'AChE de truites exposées au dichlorvos est significativement plus forte chez des animaux maintenus à de faibles taux d'oxygène dissous.

Conclusion

L'acétylcholinestérase et son inhibition peuvent être utilisés comme biomarqueur de contamination du milieu marin. Les informations sur la potentialisation des effets liés à la présence simultanée de plusieurs inhibiteurs dans le milieu sont très rares or, de nombreuses formulations insecticides comprennent plusieurs molécules différentes. Ce travail montre que les effets de toutes les associations d'organophosphorés et de carbamates testées sont de type synergique, c'est-à-dire que l'effet inhibiteur mesuré est plus grand que la simple addition des effets de chacun des composés. La plus forte synergie est obtenue avec les combinaisons associant un organophosphoré et un carbamate. De plus la synergie des effets est étroitement liée à la durée de l'incubation de l'extrait enzymatique avec les mélanges d'inhibiteurs étudiés, plus cette incubation se prolonge plus l'effet synergique est fort. Dans de nombreux cas de combinaisons les effets inhibiteurs sont augmentés d'un facteur 10. De tous les contaminants sélectionnés, seul l'arsenite montre un pouvoir d'amplification des effets inhibiteurs des OP et C. Excepté le cas particulier des effets synergiques des chlorures de zinc et de cadmium chez le callionyme, aucune autre molécule organique ou métallique présentant des risques pour l'environnement marin n'exerce d'effet synergique. Parmi les espèces testées, les vertébrés présentent les plus fortes sensibilités aux mélanges, plus particulièrement le callionyme qui semble de ce fait une bonne espèce cible. Ni les mécanismes ni les interactions mis en jeu dans l'observation de telles synergies ne sont encore démontrés, on peut seulement évoquer la possible activation des inhibiteurs pendant la phase d'incubation et les différences importantes constatées dans la sensibilité des différentes cholinestérases aux inhibiteurs comme on l'a démontré chez certains invertébrés mais aussi chez un poisson plat le flêt (*Platichthys flesus*)(Stieger et al., 1989).

PUBLICATION 3 :

Joint action of combinations of pollutants on the acetylcholinesterase activity of several marine species

Ecotoxicology, 4, 266-279 (1995)

Joint action of combinations of pollutants on the acetylcholinesterase activity of several marine species

GILLES BOCQUENÉ^{1*}, CHRISTELLE BELLANGER², YVON CADIOU and FRANÇOIS GALGANI¹

¹IFREMER, BP 1049, 44037 Nantes Cedex, France and ²Faculté de Pharmacie, Lille, France

Received 21 February 1994; accepted 27 June 1994

Acetylcholinesterase (AChE) is used as a specific biomarker of the effects of organophosphorous (OP) and carbamate (C) insecticides on the coastal marine environment. Studies of mixtures (by pairs) of five of these substances showed cumulative, synergistic inhibitory effects in all cases. The strongest synergy was observed in organophosphate–carbamate mixtures (OP–C) and the least in mixtures of substances of the same type (OP–OP, C–C). The intensity of the synergistic effect was directly related to the length of time the enzyme was incubated with the inhibitory mixtures. Among the major organic contaminants of the marine environment, DDT and lindane (organochlorines), as well as atrazine and isoproturon, are not AChE inhibitors and had no effect on the inhibitory action of the OP and C insecticides tested. Among contaminants of metallic origin, zinc chloride, cadmium chloride, tributyltin chloride and methylmercury did not inhibit AChE at the concentrations measured in the different marine compartments (water, sediment, living matter). Mercuric chloride and arsenite had a weak inhibitory action in certain organisms. Zinc chloride, cadmium chloride and arsenic enhanced the inhibitory effects of some OP and C insecticides. The dragonet (*Callionymus lyra*) proved to be a particularly sensitive target species for monitoring pollutant effects.

Keywords: organophosphorous; carbamate; AChE; synergy; marine pollution.

Introduction

The recent development of biomarkers based on the study biological responses of organisms to pollutants has provided the biochemical tools essential to the implementation of programmes for the monitoring of contaminant effects. At the initiation of ICES (International Council for the Exploration of the Sea) and UNESCO-IOC (Intergovernmental Oceanographic Commission) study groups, several international workshops have advocated the development of biochemical methods for pollutant monitoring programmes in the marine environment.

The development of a biomarker depends on numerous factors: specificity of the response, natural variability, correlation between the contaminant levels measured and the effects observed and choice of a target species (distribution, biological response, availability).

Among the major contaminants in the marine environment, insecticides cause serious ecotoxicological problems because of their strong persistence (organochlorines) and high toxicity (organophosphates and carbamates). Although the transfer of these

*To whom correspondence should be addressed.

Joint action of combinations of pollutants

pollutants to the marine environment is generally diffuse and chronic, an accident, such as the loss of several tons of carbamates (furathiocarb) from a ship at sea and their subsequent washing up on French coasts in December 1993 and January 1994, can constitute a serious ecological and economic danger requiring specific monitoring tools.

Organophosphorous compounds (OP) and carbamates (C) are powerful insecticides with an inhibitory effect on cholinesterases. Most OP and C insecticides are regarded as being non-persistent, but many reports have indicated that they are persisting for extended periods in organic soils or sediments (Barcelo *et al.* 1991, Readman *et al.* 1992). Acetylcholinesterase (AChE: EC 3.1.1.7) inhibition has been used as a biomarker of the effects of OP compounds and C (Coppage and Matthews 1974, Nemcsok *et al.* 1985, Zinkl *et al.* 1987, Day and Scott 1990). Some recent studies have shown considerable variations in AChE activity in several marine species in relation to a contamination gradient (Galgani *et al.* 1992a).

The existence of extremely low thresholds for induction of inhibitory effects suggests that detection is possible after exposure to insecticide concentrations of approximately $0.1-1 \mu\text{g l}^{-1}$ (Klaverkamp and Hobden 1980, Habig *et al.* 1986, Bocquené and Galgani 1991). Data concerning the levels of these pollutants in the different marine compartments are scarce, but studies on sediment and living matter indicate concentrations above the induction threshold (Barcelo *et al.* 1991).

The high toxicity of these products warrants consideration of their effects on aquatic organisms. Existing data concern essentially 50% lethal concentrations (LC_{50}), but a number of studies have explored cholinesterase inhibition by OP compounds and C. However, studies to determine the 50% inhibitory concentrations (IC_{50}) of contaminants or contaminant mixtures on AChE activity are rare, except for the important work of Olson and Christensen (1980). Thus, there is a real need for information on the joint toxicity of pesticides and contaminant mixtures. Although AChE shows very high specific sensitivity for OP and C, the presence of numerous organic and metallic contaminants in sediment can intensify the inhibitory effects of these insecticides in the natural marine environment where organisms are not exposed to a single toxicant but to the joint action of various toxicants.

The purpose of the present study was 2-fold. First, we wished to determine the IC_{50} value (the contaminant concentration causing 50% inhibition of AChE activity) for nine pesticides (seven insecticides, two weed-killers) and six metals or organometallic compounds in their major form in sediment or, in certain cases, their bioaccumulated organic form. Secondly, we wanted to ascertain the nature of the combined effects of a contaminant mixture on AChE activity and to search for any additive inhibitory action of OP and C. These studies were carried out on four marine species in order to determine which one had the greatest sensitivity to the contaminants.

Materials and methods

Assays on tissue homogenates

Homogenates were obtained from dorsal muscle of the dragonet (*Callionymus lyra*) and the sole (*Solea solea*), abdominal muscle of the common prawn (*Palaemon serratus*) and gill tissue of the oyster (*Crassostrea gigas*). Dragonets and soles were caught during a scientific cruise and prawns and oysters were obtained alive from local producers. Tissues were removed immediately from the living animal and homogenized

Bocquené, Bellanger, Cadiou and Galgani

(1/2 w/v) using Tris buffer 0.1 M, pH 7.8. The homogenates were then centrifuged at 10 000 g at 4 °C for 30 minutes. Supernatants were stored at -80 °C and used as the cholinesterase source.

Chemicals

The following pesticides were tested.

(1) Three organophosphorous compounds: dichlorvos or DDVP used in treatment of sea lice infestations in farmed Atlantic salmon and then discharged into the environment, fenitrothion still used massively for mosquito control and phosalone used in agriculture.

(2) Two carbamates: carbaryl and carbofuran, both used in maize fields.

(3) Two organochlorine compounds: DDT and lindane (hexachlorocyclohexane). DDT persists in the environment even though its use is now prohibited in France, whereas lindane is still widely used.

(4) One triazine (atrazine) used as a weed-killer.

(5) One urea substitute (isoproturon) also used as a weed-killer.

All the compounds were dissolved in ethanol, except the organochlorines (DDT, lindane) which were dissolved in acetone. Lindane was obtained from Sigma Chemical, carbaryl and phosalone from Rhône-Poulenc and isoproturon, dichlorvos, atrazine and carbofuran from the Institute of Organic Industrial Chemistry (Warsaw, Poland). All these reagents were of analytical grade (minimum 99%).

The following metallic or organometallic compounds were tested: zinc chloride ($ZnCl_2$), cadmium chloride ($CdCl_2$), mercuric chloride ($HgCl_2$), methylmercury chloride (CH_3HgCl_2), tributyltin chloride [$(C_4H_9)_3SnCl$] and arsenite (As_2O_3). Except for methylmercury, the other metals are important contaminants of coastal or estuarine sediment.

These compounds were dissolved in distilled water, except for methylmercury which was dissolved in ethanol. Methylmercury was a gift from D. Cossa (IFREMER, France) and the other compounds were obtained from Sigma Chemical and Merck.

Method for IC_{50} determination

The IC_{50} s of organophosphorous and carbamate inhibitors were determined first followed by those of the other substances. In joint toxicity studies, the chemicals were always tested in pairs and applied at the same time, each pair including at least one OP or C. Concentration ranges of 10^{-4} – 10^{-6} M were tested for OP and C. The other pesticides were tested at concentrations of 1000, 100, 10, 1, 0.1, 0.01 and $0.001 \mu g l^{-1}$. DDT was tested up to $10 mg l^{-1}$. Metallic and organometallic compounds were tested at concentrations of 10, 1, 0.1 and $0.001 mg l^{-1}$. Concentrations above the highest values tested are improbable in nature.

Measurements of AChE activity were performed using the colorimetric method of Ellman *et al.* (1961), with acetylthiocholine (ACTC) as substrate (2.6×10^{-3} M) at a controlled temperature of 20 °C. The enzymatic extract was pre-incubated for 60 minutes with different concentrations of chemicals (10 μl of ethanol or acetone containing variable concentrations of pollutants). Enzymatic reaction was initiated by addition of substrate and activity was measured (optical density changes) for 3 minutes on a microplate reader. The total volume of the reaction mixture was 380 μl per well.

Joint action of combinations of pollutants

Four measurements were performed simultaneously for each concentration. In all cases, contaminant effects on the DTNB reagent and the ACTC substrate were checked. No effect of ethanol or acetone on the normal AChE activity could be observed at the tested concentrations (1/38).

A software program controlled the microplate reader, data acquisition and calculation of the IC₅₀s. Mean AChE activity was determined for each of the toxic concentrations and these values were compared with the mean activity of non-toxic extracts (100% activity). Values without significant differences were discarded.

Estimation of IC₅₀s was then achieved by means of an iterative calculation (Galgani *et al.* 1992b). This system allows the determination of IC₅₀s (+ SEMs) according to asymptotic regression parameters.

Method of determining mixture effects

The combined effects of the inhibitor and contaminant were considered in terms of the potentiation of the inhibitory effects of OP and C. The diagram of Gaddum (1948), as modified by Sprague (1970) was used to interpret inhibitor interactions. As there are many ways of designating the effects of chemical agents acting simultaneously, the terms 'additive effects' and 'synergy' or 'potentiation' are used in this work rather than the terms 'more than' or 'less than' used in some studies.

The diagram of Gaddum (1948) illustrates the combination of two toxicants, with the axes indicating the concentrations or toxic units (TU). In our study, one unit of toxicant represents the IC₅₀ of a choline/sterase inhibitor (OP or C). The type of joint action was determined according to the following formula:

$$xTU_A + yTU_B = 1 TU_{(A+B)}$$

where TU is the toxic unit (IC₅₀), A and B the AChE inhibitors (OP, C or contaminant inhibitor) and x and y the proportional toxic units of A and B present in the mixture (e.g. 0.5A + 0.5B, in this case x = 0.5 and y = 0.5).

If the addition of half the concentration of toxicant A necessary to produce the IC₅₀ and half the concentration of toxicant B necessary for the same response just causes the IC₅₀, A and B are exactly additive, whereas if it causes more than the expected response, e.g. more than 50% inhibition, the joint action is synergistic. Thus,

if $x + y = 1$, the joint action is additive

if $x + y < 1$, the joint action is synergistic (the lower the total $x + y$ is, the higher the synergistic action)

if x or $y > 1$, the action is antagonistic

Figure 1 presents the diagram and terms used to describe the combined effects. If one unit of toxicant A or B is needed to produce 50% inhibition and if the same response is produced by combinations of toxicants A and B at coinciding concentrations in the lower triangle (e.g. 0.3A + 0.3B), the effect is synergistic. If they coincide in the upper triangle ($x + y = 1$), the action is still joint but simply additive.

If one toxic unit of A or B is needed to produce the response (regardless of the concentration of the other toxicant), then there is no interaction. Finally, if more than one TU of a toxicant is required (owing to the presence of the other toxicant), then the effect is antagonistic.

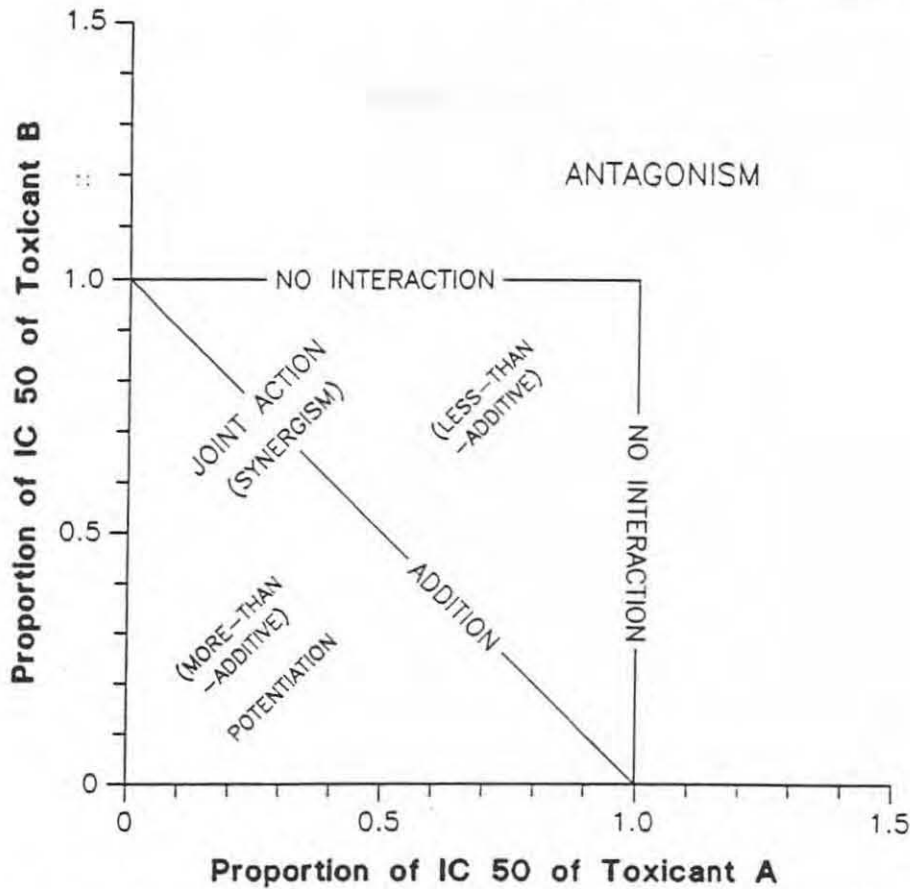


Fig. 1. Diagram modified from Gaddum (1948) showing the joint action of two toxicants.

The different enzymatic extracts were exposed to various proportional toxic units of the inhibitors (e.g. 0.1A + 0.1B, 0.2A + 0.2B, 0.5A + 0.5B) and the IC_{50} was then determined as described above.

When no inhibitory effect was observed for the contaminants, joint action was ascertained in a different way. Extracts were incubated with different concentrations of OP or C and a constant concentration of contaminant and a new IC_{50} was determined as described above. The contaminant concentration [redacted] corresponds to the highest concentration found in a seawater column, sediment or living matter. In this case, it was impossible to use the diagram of Gaddum (1948) and the results are considered in terms of variations from the original IC_{50} measured with the inhibitor alone (OP or C).

Results and discussion

Determination of the IC_{50} of organophosphates and carbamates

Influence of different exposure times on IC_{50} determination. Figure 2 shows IC_{50} determinations for different pre-incubation times, indicating that changes in the IC_{50} were closely related to the length of incubation of the enzyme with the inhibitors. Thus, the IC_{50} value of phosalone relative to dragonet AChE decreased from 9.1×10^{-7} M

Joint action of combinations of pollutants

Table 1. Concentration values in M (mean + SD) of several organophosphate and carbamate insecticides causing 50% AChE inhibition (IC₅₀) after 1 h incubation. Numbers in parentheses are replicates

	Dragonet	Sole	Prawn	Oyster
Carbaryl	3.0×10^{-7} $\pm 0.7 \times 10^{-7}$ (6)	7.8×10^{-6} $\pm 0.3 \times 10^{-6}$ (3)	1.7×10^{-7} $\pm 0.6 \times 10^{-7}$ (4)	1.5×10^{-7} $\pm 0.5 \times 10^{-7}$ (5)
Carbofuran	2.8×10^{-8} $\pm 0.7 \times 10^{-8}$ (7)	8.0×10^{-7} $\pm 0.5 \times 10^{-7}$ (3)	1.1×10^{-8} $\pm 0.3 \times 10^{-8}$ (5)	1.5×10^{-8} $\pm 0.5 \times 10^{-8}$ (5)
Dichlorvos	2.3×10^{-8} $\pm 0.4 \times 10^{-8}$ (5)	3.1×10^{-7} $\pm 0.8 \times 10^{-7}$ (6)	1.1×10^{-6} $\pm 0.2 \times 10^{-6}$ (5)	7.3×10^{-8} $\pm 1.0 \times 10^{-8}$ (6)
Fénitrothion	2.6×10^{-5} $\pm 0.5 \times 10^{-5}$ (4)	1.2×10^{-4} $\pm 0.3 \times 10^{-4}$ (5)	$> 10^{-4}$	1.4×10^{-4} $\pm 0.2 \times 10^{-4}$ (5)
Phosalone	6.2×10^{-7} $\pm 1.5 \times 10^{-7}$ (5)	2.5×10^{-6} $\pm 0.7 \times 10^{-6}$ (4)	$> 10^{-4}$	$> 5 \times 10^{-4}$

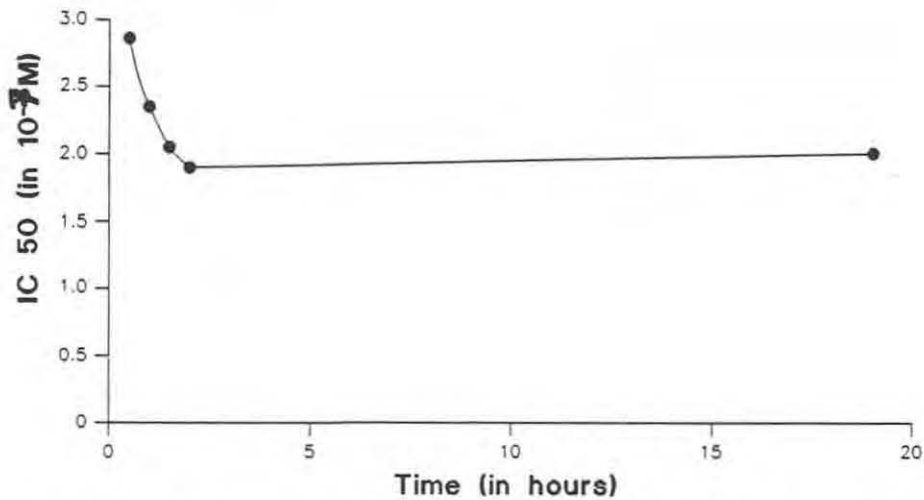


Fig. 2. Effect of various exposure times on the inhibitory action of phosalone on dragonet AChE. Results are given in concentration (in M) of phosalone causing 50% AChE inhibition (IC₅₀).

after 30 minutes of exposure to 2.8×10^{-7} M after 90 minutes. Measurements taken between 120 and 150 minutes showed that the IC₅₀ remained stable.

Thiono-type OPs or phosphorothionate are not AChE inhibitors and require metabolic activation to become strong irreversible inhibitors (Eto 1974, Klaverkamp and Hobden 1980). *In vivo*, this activation mainly occurs through the action of mixed-function oxidase enzymes (MFO) but *in vitro* the conversion is mainly due to photolysis. Phosphorothionate (P = S) pesticides, such as phosalone and fenitrothion, are converted into their oxygen analogues oxon (P = O) by different degradation pathways including photolysis. The most probable explanation of an increasing inhibition with time might be due to oxidation of phosalone that leads to the activated form. However, time dependance of the inhibitory process is also frequently indicative of irreversible inhibition. These results indicate the importance of the length of exposure to inhibitors not only in inhibitory studies but also in the field.

Bocquené, Bellanger, Cadiou and Galgani

Table 1 gives the IC_{50} values calculated for OP and C relative to four enzymatic extracts. Dichlorvos, carbaryl and carbofuran showed extremely high inhibitory activity on all four species. Thus, the IC_{50} of carbofuran was 1.1×10^{-8} M for the common prawn extract which showed the greatest sensitivity to carbamates.

These data are in agreement with the results of several authors who demonstrated the very high sensitivity of crustaceans to carbamates rather than organophosphates (Habig *et al.* 1988, Burrige and Haya 1988, Bocquené and Galgani 1991).

Olson and Christensen (1980), who worked on an extract of freshwater fish, the fathead minnow (*Pimephales promelas*), reported an IC_{50} in the order of 10^{-5} M with carbaryl, whereas the dragonet showed a much greater sensitivity to this contaminant (3.0×10^{-7} M). Compared to the sole, the dragonet was extremely sensitive both to carbofuran and dichlorvos (respectively, 2.8×10^{-8} and 2.3×10^{-8} M).

Although molluscs are less sensitive than crustaceans and vertebrates to OP and C (Bocquené *et al.* 1990), oyster gill showed good sensitivity compared to the AChE activity of the animal as a whole.

Fenitrothion and phosalone showed considerably lower inhibitory activity, particularly in the case of phosalone relative to invertebrates ($>10^4$ M). This difference between the high activity of dichlorvos and the low activity of fenitrothion and phosalone is due to the nature of the leaving group linked to phosphorus. Fenitrothion and phosalone contain the thiono (= S) rather than the oxon (= O) moiety of the dichlorvos molecule. Dichlorvos is a direct cholinesterase inhibitor and requires no activation.

Determination of the IC_{50} of the other contaminants

The other pesticides (DDT, lindane, atrazine, isoproturon) did not inhibit AChE in the four species at the maximum concentrations tested. Among the metals, no inhibitory effect was observed with zinc, cadmium and tributyltin chlorides or with methylmercury, even at 10 mg l^{-1} . Mercuric chloride showed an inhibitory effect on the oyster, with an IC_{50} of 6 mg l^{-1} . Arsenite inhibited AChE in the common prawn, sole and dragonet with IC_{50} s respectively of 4.7, 8.8 and 10.7 mg l^{-1} .

These results are similar to those published by Olson and Christensen (1980), who showed that *in vitro* incubation with 3.2×10^{-5} M of arsenite reduced activity by half. These authors observed no inhibitory effect for organochlorines such as DDT and lindane. In our study, zinc chloride failed to decrease AChE activity in any of the tested organisms, which is in agreement with the findings of Nemcsok *et al.* (1985).

However, cadmium chloride did not affect AChE activity, which is in contradiction with the findings of Olson and Christensen (1980) who reported a 50% decrease for an almost similar Cd^{2+} concentration (10^{-4} M). These authors also found an IC_{50} of 5×10^{-3} for methylmercury chloride, a concentration not compatible with that reported in fish liver ($<10^{-5}$ M) (Cossa *et al.* 1989).

Joint toxicity of organophosphorous and carbamate mixtures

Influence of various exposure times. Figure 3 shows the different values (in TU) for the toxicity of a carbaryl-phosalone mixture in a dragonet extract according to different exposure times. The effect of this mixture was simply additive after 30 minutes of incubation (1.1 TU) but became rapidly synergistic after 60 minutes (0.75 TU) and

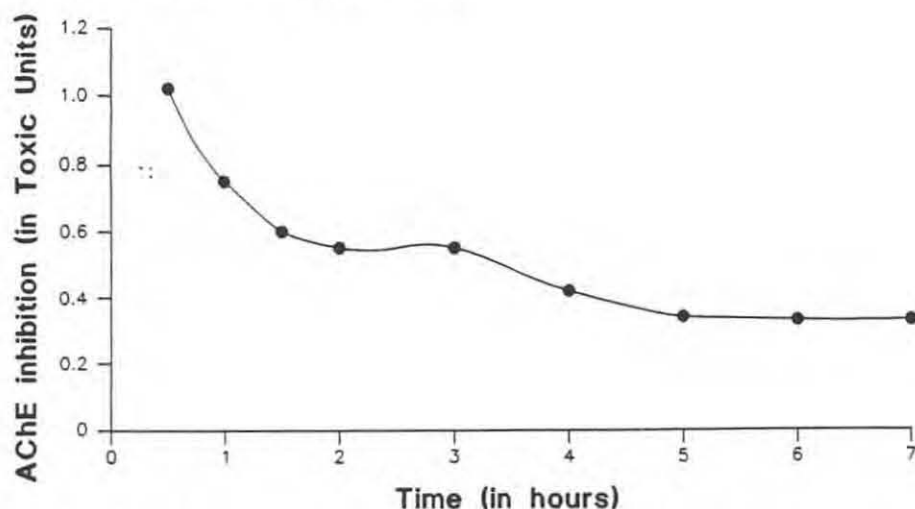
Joint action of combinations of pollutants

Fig. 3. Effect of various exposure times on the joint toxicity of carbaryl and phosalone on dragonet AChE. Results are given in toxic units (TU). (The lower the TU, the higher the synergistic action of the two inhibitors, see text for full explanation).

continued to progress for several hours. After 360 minutes, the effect of the mixture was highly synergistic (0.33 TU).

Table 2 shows that data were similar for numerous OP-C combinations in different extracts, with synergy beginning after the first 30 minutes of incubation. Unlike incubations involving a single inhibitor, exposition to a mixture continued in time. Thus, the effects of the dichlorvos-carbofuran combination on prawn AChE continued to increase at 180 and 300 minutes of incubation, with the TU decreasing from 0.34 (60 minutes) to 0.19 (180 minutes) to 0.10 (300 minutes).

Inhibitory effects of organophosphorous and carbamate mixtures. All the inhibitory OP and/or C mixtures tested showed important additive or synergistic effects (Table 3). Only the effects of the phosalone-fenitrothion mixture were not additive after 60 minutes of incubation (although Table 2 shows that exposure to this mixture for 180 minutes gave a synergistic effect).

Table 2. Effect of pre-incubation time on the joint toxicity of different combinations of organophosphates and carbamates to AChE.

	60 min pre-incubation	180 min pre-incubation
Phosalone + fenitrothion/dragonet AChE	1.10 ± 0.27	0.47 ± 0.13
Dichlorvos + carbofuran/prawn AChE	0.34 ± 0.08	0.19 ± 0.07
Phosalone + carbofuran/dragonet AChE	0.30 ± 0.08	0.15 ± 0.03
Fenitrothion + carbofuran/dragonet AChE	0.28 ± 0.08	0.13 ± 0.05
Carbofuran + carbaryl/sole AChE	0.74 ± 0.09	0.41 ± 0.09

Results are given in toxic units ± SD of four determinations. (The lower the TU the higher the synergistic action of the two inhibitors, see text for full explanation.)

Bocquené, Bellanger, Cadiou and Galgani

Table 3. Joint toxicity of organophosphorous and carbamate mixtures on AChE from different marine organisms

	Carbofuran	Dichlorvos	Fenitrothion	Phosalone
Carbaryl				
Dragonet	0.72 ± 0.06	0.50 ± 0.04	0.58 ± 0.05	0.75 ± 0.02
Sole	0.74 ± 0.06	0.38 ± 0.03	0.36 ± 0.02	0.20 ± 0.01
Prawn	0.76 ± 0.07	0.70 ± 0.05	nd	nd
Oyster	0.72 ± 0.05	0.72 ± 0.05	0.56 ± 0.04	nd
Dichlorvos				
Dragonet	0.42 ± 0.03	-	-	-
Sole	0.24 ± 0.01	-	-	-
Prawn	0.34 ± 0.03	-	-	-
Oyster	0.76 ± 0.08	-	-	-
Fenitrothion				
Dragonet	0.28 ± 0.02	0.66 ± 0.06	-	-
Sole	0.45 ± 0.03	0.54 ± 0.03	-	-
Prawn	nd	nd	-	-
Oyster	0.45 ± 0.04	0.68 ± 0.06	-	-
Phosalone				
Dragonet	0.30 ± 0.02	0.20 ± 0.01	1.10 ± 0.09	-
Sole	0.22 ± 0.01	0.58 ± 0.03	0.25 ± 0.02	-
Prawn	nd	nd	nd	-
Oyster	nd	nd	nd	-

Results are given in toxic units ± SD of four determinations, nd = values not determinable. (The lower the TU, the higher the synergistic action of the two inhibitors, see text for full explanation.)

Synergistic effects on the four species were least evident with the carbofuran-carbaryl combination. In general, OP-C combinations had the strongest synergistic effects and OP-OP or C-C mixtures were less inhibitory.

Thus, the lowest values (providing the strongest synergies) were found for carbaryl-phosalone (0.2 TU in sole), dichlorvos-carbofuran (0.24 TU in sole) and phosalone-carbofuran (0.22 TU in sole). Among the four species tested, the two fish (sole and dragonet) showed the greatest sensitivity to the combined effects of inhibitors, the oyster being the least sensitive species.

Synergistic effects were notable, particularly for dragonet and sole in which many OP-C combinations reduced the AChE activity of extracts by 50% when inhibitor levels were only one-tenth of the IC₅₀ (0.2 TU), even at short incubation times (60 minutes).

Acute toxicity levels (generally IC₅₀ *in vitro*) have been determined for most OP and C, whereas data for mixtures are nearly non-existent. As all OP and C insecticides exert their toxic action by attacking AChE, it is logical that exposure to more than one will produce an additive effect at least (WHO 1986). In fact, the few available studies indicate that the joint action of the two anticholinesterase compounds is mainly synergistic (Eto 1974). This type of synergistic inhibition can come about in a number of ways and it is not possible to give a general scheme. In *in vitro* experiments, one plausible explanation could be related to the considerable polymorphism of AChE. AChE is highly polymorphic and its different molecular forms are classified as globular

Joint action of combinations of pollutants

(monomer, dimer and tetramer) or asymmetric (one, two or three tetramers linked to a collagen tail) (Toutant and Massoulié 1988, Bon *et al.* 1988). This classification only describes the quaternary structure of the molecules and does not take into account their interaction with detergents. The existence or the absence of a direct interaction of AChE with non-denaturing detergent is now used to characterize amphiphilic and hydrophilic forms of AChE from most species: one class does not bind detergent and is hydrophilic, the second class interacts with detergents and for this reason is called hydrophobic or amphiphilic (Fournier *et al.* 1987, Lenoir-Rousseaux *et al.* 1988).

The major form of AChE (60–80%) is an amphiphilic dimer linked to membranes (membrane-bound AChE) while the detergent-insensitive form, the hydrophilic component (40–20%), is a water-soluble dimer or tetramer of the catalytic sub unit (secreted AChE?). Recent works on the catalytic properties and inhibitor sensitivity of each form show a marked difference in sensitivity between forms.

Depending on the nature of the inhibitor, a higher sensitivity is found either with the membrane-bound AChE or with the hydrophilic AChE (Chang and Opperman 1992, Mulder and Bakker 1992, G. Bocquené unpublished data) while some authors found that the different molecular forms respond similarly to inhibition (Zhu and Brindley 1992).

As AChE is described as an allosteric enzyme, numerous conformational changes influenced by the binding of the inhibitor molecules can occur. The mechanisms by which inhibitory effects could be enhanced, e.g. much greater than what would be expected from the simple addition of effects caused by the individual inhibitors, are not well understood, especially in crude homogenates.

Joint toxicity of OP or C with another contaminant

Among the organic contaminants tested, atrazine (0.003 mg l^{-1}), isoproturon (0.01 mg l^{-1}), DDT (1 mg l^{-1}) and lindane (0.1 mg l^{-1}) did not enhance the inhibitory effects of OP and C either additively or synergistically. Among the metallic contaminants, only zinc chloride (10 mg l^{-1}) and cadmium chloride (0.1 mg l^{-1}), in association with dichlorvos or phosalone, showed an enhanced inhibitory effect on AChE, but only (and inexplicably) in the dragonet (Table 4). Associations of these chlorides with carbaryl, carbofuran and fenitrothion caused no additive effect in any of the species tested. Notable synergistic effects were found with arsenite for which the IC_{50} in prawn, sole and dragonet extracts ranged between 4.7 and 10.7 mg l^{-1} . Table 5 shows that all OP–arsenite and C–arsenite combinations had synergistic effects, with fish extracts again proving more sensitive to the contaminant combination. This would seem particularly noteworthy since total arsenic levels in marine sediment generally range between 5 and 20 mg kg^{-1} but can reach 100 mg kg^{-1} (Michel 1993).

Arsenic in oxidized aquatic systems occurs mainly in the form of arsenate ions (Michel *et al.* 1992). Arsenite (reduced arsenic) is found in water when biological activity is high, as in sediment. Marine organisms can accumulate high concentrations of arsenite, which was measured at $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ in the muscle of dogfish (*Scyliorhinus canicula*) captured in the English Channel (Cossa *et al.* 1989). Accumulated organic arsenic occurs essentially in arsenocholine and arsenobetaine forms and the latter can inhibit cholinesterase in mussel adductor muscle at $6 \times 10^{-5} \text{ M}$ (G. Bocquené unpublished results).

Bocquené, Bellanger, Cadiou and Galgani

Table 4. Effects of zinc chloride (10 mg l⁻¹) and cadmium chloride (0.1 mg l⁻¹) on the inhibitory effects of several organophosphorous and carbamate insecticides on dragonet AChE

	ZnCl ₂	CdCl ₂
Carbaryl	ns	ns
Carbofuran	ns	ns
Dichlorvos	0.64	0.78
Fenitrothion	ns	ns
Phosalone	0.61	0.67

Results are expressed as the ratio IC_{50c}/IC_{50o} where IC_{50o} is the original IC_{50} of dichlorvos or phosalone and IC_{50c} the IC_{50} in the presence of ZnCl₂ or CdCl₂. This ratio was calculated only when IC_{50c} and IC_{50o} were significantly different ($p < 0.05$; Student's *t*-test), ns = IC_{50c} and IC_{50o} not significantly different ($p > 0.05$).

Table 5. Joint toxicity of organophosphate and carbamate mixtures with As₂O₃

Carbaryl	
Callionymus	0.47 ± 0.04
Sole	0.34 ± 0.04
Prawn	0.44 ± 0.05
Oyster	nd
Carbofuran	
Callionymus	0.36 ± 0.03
Sole	0.23 ± 0.01
Prawn	0.43 ± 0.04
Oyster	nd
Dichlorvos	
Dragonet	0.20 ± 0.01
Sole	0.28 ± 0.02
Prawn	0.51 ± 0.03
Oyster	nd
Fenitrothion	
Dragonet	0.35 ± 0.03
Sole	0.30 ± 0.02
Prawn	nd
Oyster	nd
Phosalone	
Dragonet	0.23 ± 0.01
Sole	0.39 ± 0.03
Prawn	nd
Oyster	nd

Results are given in toxic units ± SD of four determinations, nd = values not determinable. (The lower the TU, the higher the synergistic action of the two inhibitors, see text for full explanation.)

Joint action of combinations of pollutants

Conclusion

As AChE is inhibited by OP and C insecticides, it can be used as a biomarker of contamination in the marine environment. Although numerous insecticide formulations contain several different contaminant substances, there is very little data on the potentiation of their effects on the environment. The effects of all OP and C associations tested in our study were synergistic, i.e. the total inhibitory effect was greater than the simple addition of the respective effects of each compound. The strongest synergy was obtained with OP-C combinations. Moreover, synergistic effects were closely related to the length of time the enzymatic extract was incubated with the inhibitory mixtures, tending to be stronger as incubation time increased. For many combinations, inhibitory effects were enhanced 10-fold. Among all the contaminants tested, only arsenic enhanced the inhibitory effects of OP and C. Except for the synergistic effects of zinc and cadmium chlorides on the dragonet, no other organic or metallic substance of risk to the marine environment exerted a synergistic effect. Vertebrates showed the highest sensitivity to the mixtures and the dragonet would appear to be a good target species. From an ecotoxicological point of view, it is of importance to realize that organisms are not exposed to a single toxicant but to a mixture of them. This study shows that, in all cases, exposure to two cholinesterase inhibitors leads to an increasing inhibitory effect. The high sensitivity of marine organisms to mixtures of OP and C, the persistence of numerous residues of these highly toxic compounds in the marine sediment (although they are generally found to be below the limits of chemical detection) and the cumulative effects of various organic and organometallic contaminants may cause significant damage to the marine resource.

Acknowledgements

The authors wish to thank Louis Giboire for performing the drawings and James Gray for correcting the text.

References

- Barcelo, D., Sole, M., Durand, G. and Albaiges, J. (1991) Analysis and behaviour of organophosphorous pesticides in a rice crop field. *Fresenius J. Anal. Chem.* **339**, 676-83.
- Bocquené, G. and Galgani, F. (1991) Acetylcholinesterase activity in the common prawn (*Palaemon serratus*) contaminated by carbaryl and phosalone. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **22**, 337-45.
- Bocquené, G., Galgani, F. and Truquet, P. (1990) Characterisation and assay conditions for the use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. *Mar. Environ. Res.* **30**, 75-89.
- Bon, S., Toutant, J.P., Khaled, M. and Massoulié, J. (1988) Amphiphilic and nonamphiphilic forms of *Torpedo*: II. Electrophoretic variants and phosphatidylinositol phospholipase C-sensitive and insensitive forms. *J. Neurochem.* **51**(3), 776-85.
- Burridge, L.E. and Haya, K. (1988) The use of a fugacity model to assess the risk of pesticides on the aquatic environment on Prince Edward Island. *Adv. Environ. Sci. Technol.* **22**, 193-203.
- Chang, S. and Opperman, C.H. (1992) Separation and characterization of *Heterodera glycines* acetylcholinesterase molecular forms. *J. Nematol.* **22**(4), 481-8.

Bocquené, Bellanger, Cadiou and Galgani

- Coppage, D.L. and Matthews, E. (1974) Short-term effects of organophosphate insecticides on cholinesterases of estuarine fishes and pink shrimp. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **11**(5), 438-88.
- Cossa, D., Auger, D., Averty, B., Luçon, M., Masselin, P., Noel, J. and Sanjuan, J. (1989) Atlas des niveaux de concentrations en métaux, métalloïdes et composés organochlorés dans les produits de la pêche côtière française. *IFREMER. DERO.* **89-10-MR 2-38**.
- Day, K.E. and Scott, I.M. (1990) Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides. *Aquat. Toxicol.* **18**, 101-14.
- Ellman, G.L., Courtney, K.O., Andrres, V. and Featherstone, R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88-95.
- Eto, M. (1974) *Organophosphorus pesticides: Organic and Biological Chemistry*. CRC Press, Cleveland, OH.
- Fournier, D., Cuany, A., Bride, J.M. and Bergé, J.B. (1987) Molecular polymorphism of head acetylcholinesterase from adult houseflies (*Musca domestica* L.). *J. Neurochem.* **49**(5), 1455-61.
- Gaddum, J.H. (1948) *Pharmacology*, 3rd edn. Oxford University Press, London.
- Galgani, F., Bocquené, G. and Cadiou, Y. (1992a) Evidence of variation in cholinesterase activity in fish along a pollution gradient in the North Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **91**(1-3), 77-82.
- Galgani, F., Cadiou, Y. and Gilbert, F. (1992b) Simultaneous and iterative weighted regression analysis of toxicity tests using a microplate reader. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **23**, 237-43.
- Habig, C., Di Giulio, R.T., Nomeir, A.A. and Abou-Donia, M.B. (1986) Comparative toxicity, cholinergic effects and tissue levels of S,S,S,-Tri-n-butyl phosphorotrithioate (DEF) to Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and Blue crab (*Callinectes sapidus*). *Aquat. Toxicol.* **9**, 193-206.
- Habig, C., Di Giulio, R.T. and Abou-Donia, M.B. (1988) Comparative properties of Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and Blue crab (*Callinectes sapidus*) acetylcholinesterases. *Comp. Biochem. Physiol.* **91C**(2), 293-300.
- Klaverkamp, J.F. and Hobden, B.R. (1980) Brain acetylcholinesterase inhibition and hepatic activation of acephate and fenitrothion in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **37**, 1450-3.
- Lenoir-Rousseaux, J.J., Arpagaus, M. and Toutant, J.P. (1988) Separation and characterization of hydrophilic and detergent-interacting components of brain acetylcholinesterase from *Tenebrio molitor* L. *Comp. Biochem. Physiol.* **90B**(1), 29-35.
- Michel, P. (1993) L'arsenic en milieu marin. Biogéochimie et écotoxicologie. *IFREMER. Repère Océan* **4**.
- Michel, P., Averty, B., Noel, J. and Sanjuan, J. (1992) Evaluation of dissolved and particulate arsenic flux in the Dover Strait. *Oceanol. Acta.* **16**(5-6), 585-91.
- Mulder, J.G. and Bakker, J. (1992) Kinetics of inhibition of two forms of acetylcholinesterase from *Panagrellus redivivus* by organophosphorous and carbamate compounds. *Fund. Appl. Nematol.* **15**(1), 19-23.
- Nemcsok, J., Orban, L., Dobber, L. and Szepealussy, J. (1985) Acetylcholinesterase activity measurements as a tool for demonstrating the possible cause of fish decay. *Acta Biol. Szeged.* **31**, 9-12.
- Olson, D.L. and Christensen, G.M. (1980) Effects of water pollutants and other chemicals on fish acetylcholinesterase *in vitro*. *Environ. Res.* **21**, 327-35.
- Readman, J.W., Liong Wee Kwong, L., Mee, L.D., Bartocci, J., Nilve, G., Rodriguez-Solano, J.A. and Gonzales-Farias, F. (1992) Persistent organophosphorous pesticides in tropical marine environments. *Mar. Pollut. Bull.* **24**(8), 398-402.
- Sprague, J.B. (1970) Measurement of pollutant toxicity to fish. II. Utilizing and applying bioassay results. *Water Res.* **4**, 3-32.

Joint action of combinations of pollutants

- Toutant, J.P. and Massoulié, J. (1988) Cholinesterases: tissue and cellular distribution of molecular forms and their physiological regulation. In V.P. Whittaker *Handbook of experimental Pharmacology*. **86**, 167–224 Springer-Verlag, Berlin.
- Wang, C. and Murphy, S.D. (1982) Kinetic analysis of species difference in acetylcholinesterase sensitivity to organophosphate insecticides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **66**, 409–19.
- WHO (1986) IPCS. *International Programme on Chemical Safety. Organophosphorous Insecticides, a General Introduction*. Environmental Health Criteria **63**, OMS, Geneva.
- Zinkl, G.J., Shea, P.J., Nakamoto, R.J. and Callman, J. (1987) Brain cholinesterase activity of rainbow trout poisoned by carbaryl. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **38**, 29–35.
- Zhu, K.Y. and Brindley, W.A. (1992) Molecular properties of acetylcholinesterase purified from *Lygus hesperus* knight. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **22(3)**, 253–60.

CHAPITRE 3 :

**QUELQUES APPLICATIONS DES MESURES DE
CHOLINESTERASES DANS LE MILIEU MARIN**

3-QUELQUES APPLICATIONS DES MESURES DE CHOLINESTERASES DANS LE MILIEU MARIN

L'évaluation du risque écotoxicologique est la première préoccupation des autorités ayant en charge la protection de l'environnement. Le développement de biomarqueurs d'exposition pour évaluer les effets biologiques de la contamination procure aux acteurs de cette protection les outils indispensables à l'estimation du danger lié à la contamination du milieu. Ces outils sont à des stades de développement plus ou moins avancés mais nécessitent tous une étape de validation sur le terrain. Le chemin est souvent long entre les modèles et expérimentations *in vitro*, très souvent réducteurs, où l'essentiel des paramètres est contrôlé et la réalité du milieu qui intègre toutes les composantes de la complexité biologique et environnementale. Malgré ces difficultés qui se traduisent par une interprétation incomplète des données il ne faut pas perdre de vue qu'un biomarqueur est aussi un signal d'alarme précoce qui permet de localiser des zones sensibles et de quantifier le degré d'atteinte du milieu par la pollution.

Plusieurs programmes scientifiques et quelques campagnes océanographiques ont été l'occasion d'appliquer la mesure des cholinestérasés à des organismes capturés dans le milieu.

On s'intéressera dans un premier temps à l'étude *in situ* des activités cholinestérasiques de différentes espèces dans plusieurs zones marines contaminées. La première campagne a lieu en Mer du Nord dans un contexte scientifique particulier puisqu'il s'agit d'une étude intégrant divers biomarqueurs d'exposition aux polluants (dont les cholinestérasés) chez des animaux prélevés sur un gradient de contamination connu en Mer du Nord, en collaboration avec des chimistes de l'environnement marin. A l'échelle océanique une telle configuration (le gradient de pollution) est précieuse d'autant que la mesure des cholinestérasés est faite en parallèle avec d'autres marqueurs d'exposition (EROD, métallothionéines) sur les mêmes stations. De nombreuses mesures chimiques concernant les métaux lourds, les insecticides organochlorés, les hydrocarbures aromatiques et les congénères PCBs dans le sédiment et la matière vivante ont été réalisées simultanément aux prélèvements d'organismes. On regrettera après coup que les organophosphorés et les carbamates n'aient pas été intégrés à un tel programme mais les difficultés analytiques rencontrées dans la mesure de ces contaminants expliquent cette absence.

Dans une seconde campagne en Baie de Vilaine on s'est intéressé aux cholinestérasés de callyonyme dans un espace géographique beaucoup plus

restreint en comparant la réponse des AChEs musculaires à celles du cerveau. L'île de la Martinique, très grande consommatrice d'insecticides OP et C, sera le troisième site étudié avec un travail sur les cholinestérases de poissons chirurgiens des récifs coralliens. Enfin une étude des cholinestérases d'espèces méditerranéennes cloturera ce volet.

Dans une seconde partie on s'intéressera plus particulièrement aux possibilités de détection *in vitro* d'effets inhibiteurs liés à des rejets de boues de dragage ou de sédiments d'origines diverses.

Enfin les effets sur des mollusques conchylicoles d'un traitement au dichlorvos, tel qu'il est utilisé dans les stations aquacoles contre de nombreux parasites copépodes seront décrits et discutés.

3-1. Mesure des activités AChE chez la limande sur une radiale contaminée de la Mer du Nord

3-1-1. Localisation du gradient de pollution.

A l'initiative de deux organisations internationales (le CIEM et l'IOC de l'UNESCO), il a été organisé en Mars 1990 un atelier d'évaluation des effets biologiques des contaminants sur l'étude du German Bight Transect en Mer du Nord qui a regroupé à la fois chimistes et biologistes. Le German Bight Transect est une radiale située au Nord-Ouest de Bremerhaven (ICES, 1990). Cette radiale consiste en une ligne diagonale de neuf stations sur une distance de 200 miles marins (\cong 370 km). La première station (station 1) est localisée dans l'estuaire de deux fleuves importants, l'Elbe et la Weser, et la neuvième station (station 9) est située sur le Dogger Bank, large banc de pêche au centre géographique de la Mer du Nord (figure 19).

Le German Bight Transect est représenté par une transversale traversant un gradient connu de pollution formé par les apports terrigènes des deux fleuves l'Elbe (1100 km) et la Weser (790 km) et lié à la courantologie générale de la Mer du Nord. Les données collectées depuis longtemps par la German Hydrographic Institution et concernant essentiellement les apports contaminants d'origine métallique et pétrolière ont apporté des informations indispensables (nature et degré de pollution) au choix plus particulier de cette transversale. Les stations ont été sélectionnées pour certaines de leurs caractéristiques communes telles que la profondeur (entre 19 et 43 m), le type de sédiment (de vaseux à sableux) et la présence dans le milieu des mêmes espèces mais aussi à cause de différences significatives dans l'intensité et la nature de leur contamination notamment vis-à-

vis des contaminants suivants : organochlorés, métaux, hydrocarbures aromatiques (Stebbing et Dethlefsen, 1992).

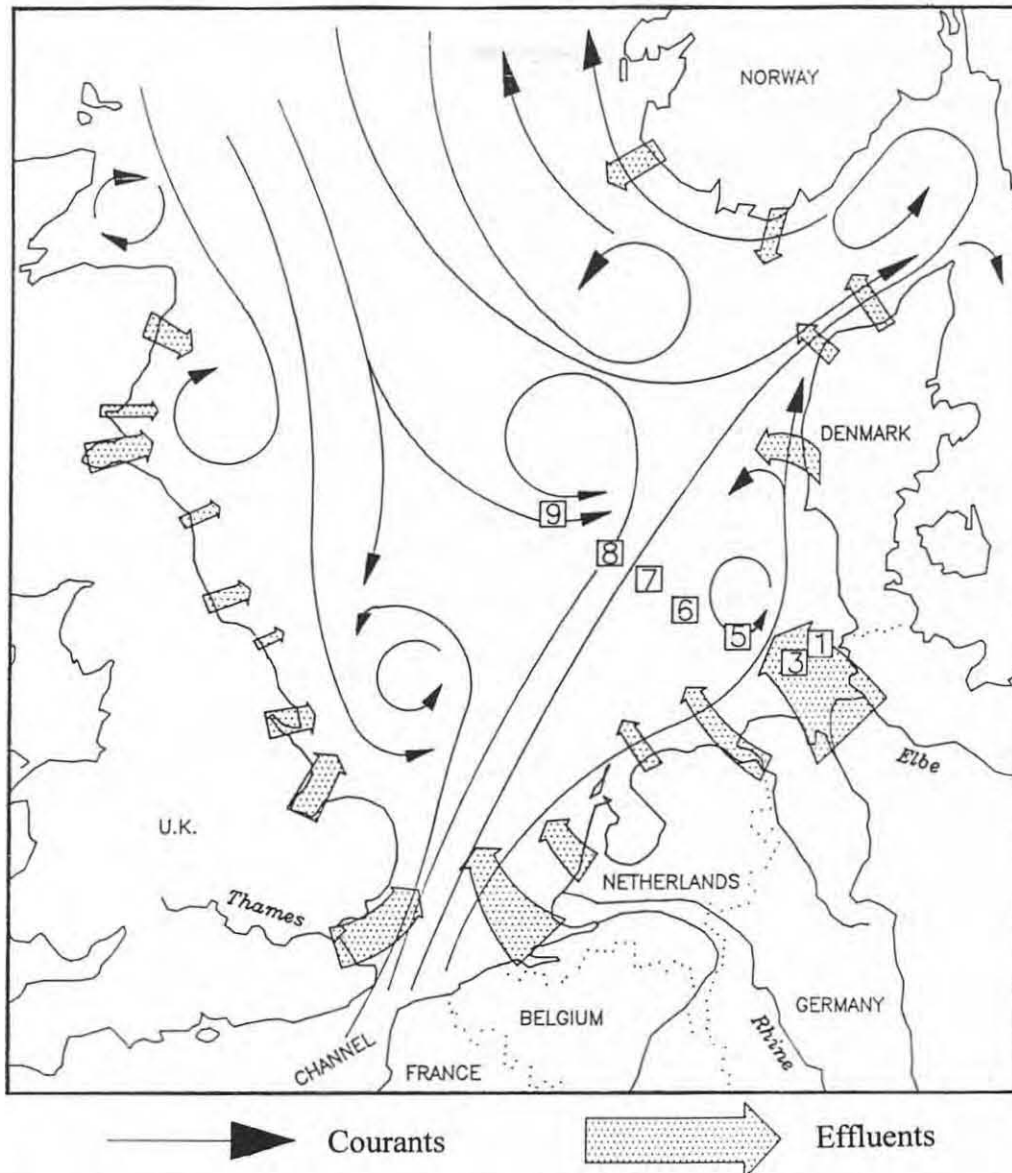


Figure 19 : Localisation des stations d'étude du German Bight en Mer du Nord. Les courants dominants en Mer du Nord ainsi que les principaux effluents sont matérialisés par des flèches.

3-1-2. Etudes des activités cholinestérasiques de la limande (*Limanda limanda*) du German Bight Transect.

La limande a été retenue en raison de son abondance dans cette zone et des priorités émises sur le choix d'une espèce type dans le cadre du monitoring des effets des polluants (espèce indigène, au contact du sédiment). Des chalutages quotidiens pendant deux semaines ont permis de collecter de nombreux lots de

limandes en provenance des différentes stations. Les campagnes de prélèvement n'ont pas concerné les stations 2 et 4, situées à trop grande proximité des stations 1 et 3.

Sept lots de 10 individus (5 males et 5 femelles) homogènes en taille (18-22 cm) ont été récoltés sur chacun des 7 sites suivants 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9. Les poissons sont tous pêchés durant la même campagne et dans les mêmes conditions. Ils parviennent vivants au laboratoire. Les activités AChE et BuChE sont mesurées dans différents organes. Les résultats regroupés dans le tableau 21 montrent que les activités cholinestérasiques sont fortes dans le cerveau et le muscle de cette espèce. L'activité AChE est largement majoritaire dans le cerveau ou l'activité BuChE ne représente que 3% de l'activité AChE tandis qu'elle est nettement plus forte dans le muscle puisqu'elle atteint 56% de l'activité AChE. Le choix du muscle est justifié à la fois par son prélèvement plus simple que celui du cerveau mais aussi par l'existence d'une forte activité BuChE qui va permettre la comparaison des niveaux des deux activités AChE et BuChE sur les différentes stations.

Organe	Activité AChE	Activité BuChE
Cerveau	559 ± 124	17.6 ± 10.8
Branchies	36 ± 13	10.4 ± 13.0
Foie	118 ± 30	41.7 ± 10.6
Muscle	199 ± 53	111.5 ± 17.2

Tableau 21 : Hydrolyse de l'AcSCh et de la BuSCh dans 4 organes de la limande. Les activités cholinestérasiques sont exprimées en nm de substrat (AcSCh ou BuSCh) hydrolysées par mg de protéine par mn. Les activités sont la moyenne ± E.T. de quatre déterminations.

Un gramme de tissu musculaire est prélevé sur chaque poisson. Après broyage et centrifugation selon la méthode décrite précédemment (voir 1-3-1-2.), les dosages d'activité acétylcholinestérasique (AChE) et butyrylcholinestérasique (BuChE) ont été réalisés selon la méthode d'Ellman (1961) avec l'acétylthiocholine et la butyrylthiocholine comme substrats spécifiques. Les mesures de ces activités sont données par station sur les figures 20 et 21.

D'autre part, la constante de Michaelis K_M qui figure l'affinité d'une enzyme pour un substrat donné est déterminée sur chacun des prélèvements grâce à un logiciel de calcul à partir du lecteur de microplaques (fig. 22).

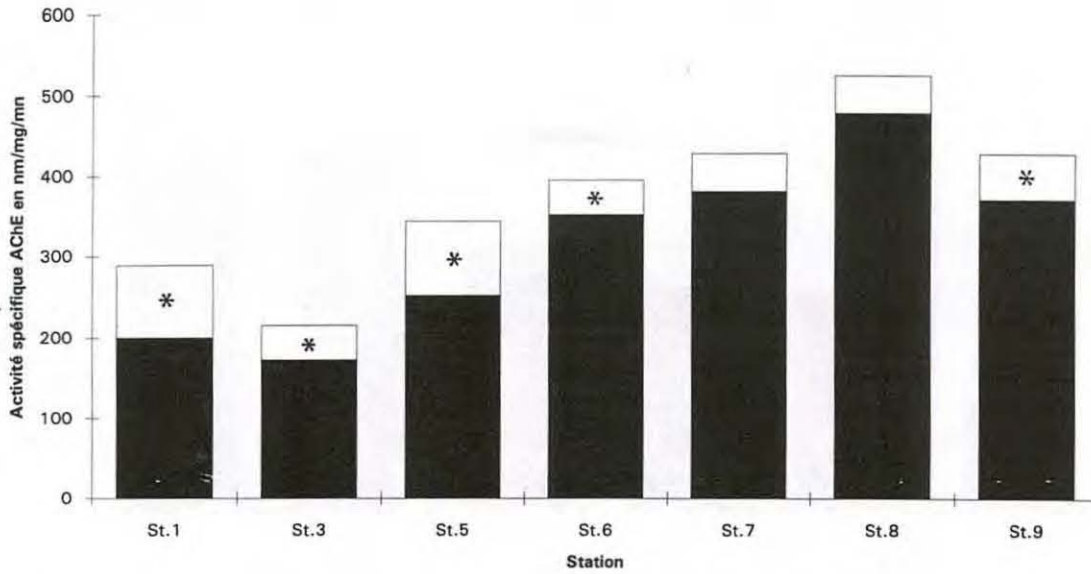


Figure 20 : Hydrolyse de l'AcSCh par des extraits musculaires de limandes capturées sur 7 stations du German Bight Transect.

Les résultats sont la moyenne \pm E.T. des activités individuelles de 10 animaux par station. Ils sont exprimés en nm de substrat AcSCh hydrolysées/minute/mg protéine. Les mêmes animaux ont été utilisés pour la mesure des activités d'hydrolyse de l'AcSCh et de la BuSCh. Les activités des stations marquées d'un astérisque sont significativement plus faibles que celles de la station 8 (test t de Student, $p < 0.01$).

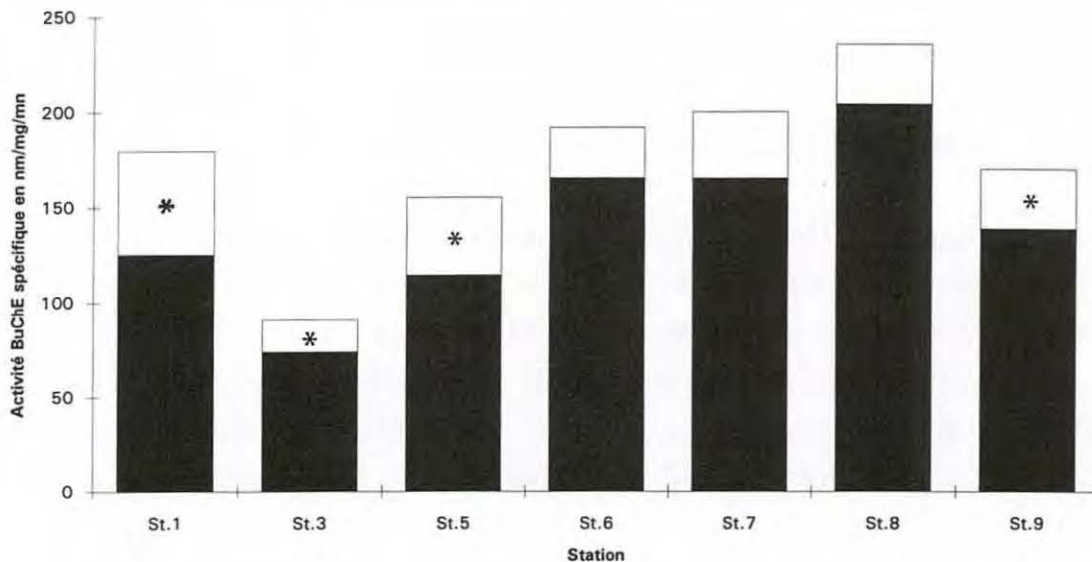


Figure 21 : Hydrolyse de la BuSCh par des extraits musculaires de limandes capturées sur 7 stations du German Bight Transect.

Les résultats sont la moyenne \pm E.T. des activités individuelles de 10 animaux par station. Ils sont exprimés en nm de substrat AcSCh hydrolysées/minute/mg protéine. Les mêmes animaux ont été utilisés pour la mesure des activités d'hydrolyse de l'AcSCh et de la BuSCh. Les activités des stations marquées d'un astérisque sont significativement plus faibles que celles de la station 8 (test t de Student, $p < 0.01$).

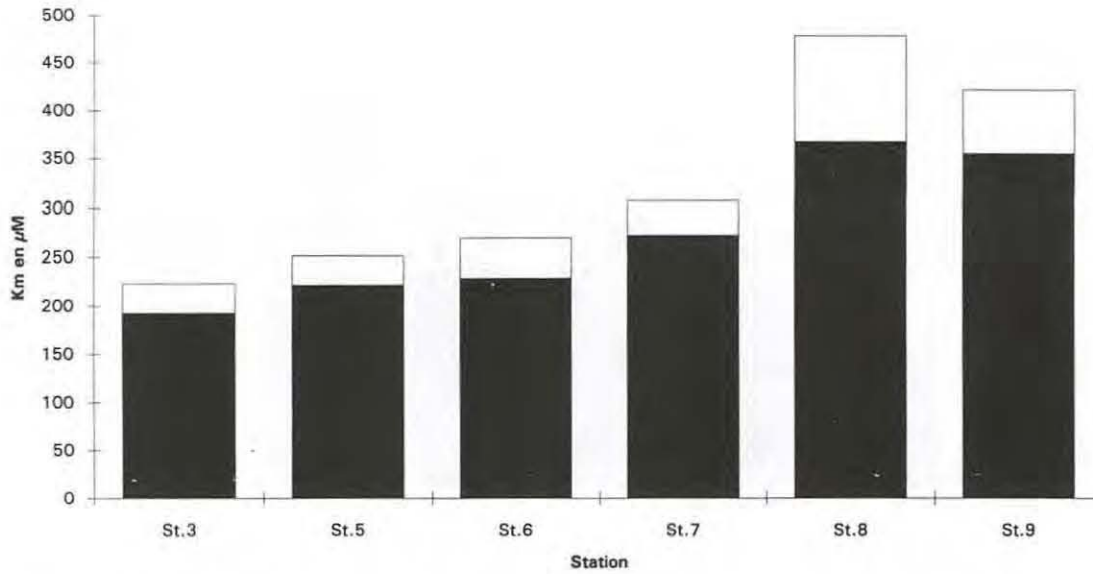


Figure 22 : Valeurs de Km pour l'acétylthiocholine des extraits enzymatiques de muscles de limandes sur 6 stations du German Bight Transect.

La constante de Michaelis est exprimée en moyenne \pm E.T. de 4 à 7 analyses par détermination à partir d'un pool de 10 individus par station.

Les animaux des deux premières stations 1 et 3 montrent des activités AChE et BuChE fortement et significativement plus faibles que les mêmes activités mesurées sur des poissons provenant de la station 8 ($p < 0.05$). De plus, le retour à des activités plus fortes se fait de manière progressive en fonction de l'éloignement des zones littorales plus fortement contaminées.

Globalement, les limandes montrent un gradient d'activités spécifiques tout le long de la radiale avec des valeurs AChE et BuChE qui augmentent de la station 3 située dans le panache des deux fleuves vers la station 8 au large. Sur cette station, les limandes présentent l'activité AChE la plus forte avec 479 ± 46 nm/mg/mn tandis que les animaux de la station 3 montrent les plus faibles activités avec 172 ± 43 nm/mg/mn soit une différence en niveau d'activité de 64%. Le profil des activités BuChE est semblable bien qu'elles soient sensiblement plus faibles. Il est intéressant de noter une nouvelle chute significative ($p < 0.05$) de l'activité des animaux pêchés sur la station 9.

Le calcul de l'affinité des extraits enzymatiques pour l'acétylthiocholine fait apparaître un variation dans l'affinité des cholinestérases qui ne peut être interprétée que par la disparition d'une forme de cholinestérase dans les zones littorales (St.1, 3 et 5).

3-3-3-. Discussion

Les activités cholinestérasiques des limandes du German Bight Transect varient en fonction du gradient de pollution attendu sur cette zone. Il est probable que les résultats indiquent un gradient de l'effet global de la contamination en relation avec les apports des deux fleuves l'Elbe et la Weser. Les différences de niveaux d'activité entre les stations ainsi que la tendance générale à l'augmentation des activités au fur et à mesure de l'éloignement du panache des fleuves suggèrent un effet de dilution des apports. Les effets les plus forts sont mesurés sur les stations 1 et 3 situées dans le panache. La comparaison des activités mesurées sur la station 9 (Dogger Bank) et la station 8 révèlent une chute d'activités sur Dogger Bank. L'accumulation de contaminants sur cette zone est connue des scientifiques allemands, notamment, depuis plusieurs années. Elle est confirmée par les analyses de contaminants réalisées durant cette campagne. Le gradient de contamination est partiellement justifié par la courantologie générale des masses d'eau en Mer du Nord (Fig.19) qui montre que les courants descendants parallèles aux côtes anglaises et les courants entrant de la Manche viennent mollir sur Dogger Bank et les matières en suspension qu'ils transportent sédimentent fortement sur cette zone. Dethlefsen (1988) souligne la forte contamination de Dogger Bank et des organismes qui y sont prélevés, caractérisés par des teneurs élevées en organochlorés et en métaux lourds. Au contraire les stations 7 et 8 sont localisées sur des zones balayées par de forts courants.

Les informations apportées par le calcul de la constante d'affinité, parce qu'ils ont été obtenus à partir d'extraits bruts montrent que l'affinité des cholinestérases décroît au fur et à mesure que l'activité augmente. Le polymorphisme des cholinestérases est important chez la plupart des vertébrés et certaines formes présentent des résistances ou des sensibilités particulières, cette modification de l'affinité peut être justifiée par l'inhibition sélective d'une forme sensible au profit de la forme plus résistante. Ainsi l'affinité calculée chez les individus de la station 3 ne prend pas en compte l'affinité de la forme inhibée. Dans cette hypothèse, le retour progressif à une situation "normale" sur la station 8 permet d'intégrer à nouveau la forme la plus sensible dans le calcul.

Les études de variabilité des activités cholinestérasiques chez la limande ne montrent pas de variations liées au sexe ou à la taille dans la fourchette des tailles testées (12-25 cm)(Galgani et Bocquené, 1992a). La relation apparente entre les différences d'activités mesurées et le gradient de contamination de cette région évoque la présence dans le biotope de ces poissons de composés à pouvoir inhibiteur vis-à-vis des cholinestérases. L'éventualité de la présence de résidus

d'organophosphorés et de carbamates ne peut être vérifiée car ces contaminants ne sont pas suivis de manière régulière. Des données plus anciennes (Deutsches Hydrographisches Institut, 1988) font état en Janvier 1987 de la présence dans cette zone de méthylparathion dans l'eau. Les concentrations mesurées à partir des eaux douces de l'embouchure de l'Elbe illustrent l'effet de panache lié à la dilution en mer (fig.23) et concordent avec le gradient de pollution sur cette zone et il faut avoir présent à l'esprit que la contamination du sédiment est globalement beaucoup plus forte que celle de la colonne d'eau.

Sur la même zone, Danischewski et al. (1994) rapporte l'inhibition de 50% des cholinestérases du muscle adducteur de la moule (*Mytilus edulis*) dans l'estuaire de l'Elbe et la Weser après deux forts coups de vent qui ont provoqué la remise en suspension du matériel organique sédimentaire. Cette resuspension a été l'occasion d'un relargage de molécules adsorbées qui s'est traduit notamment par une élévation significative de la concentrations en contaminants (polychlorobiphénils,PCBs).

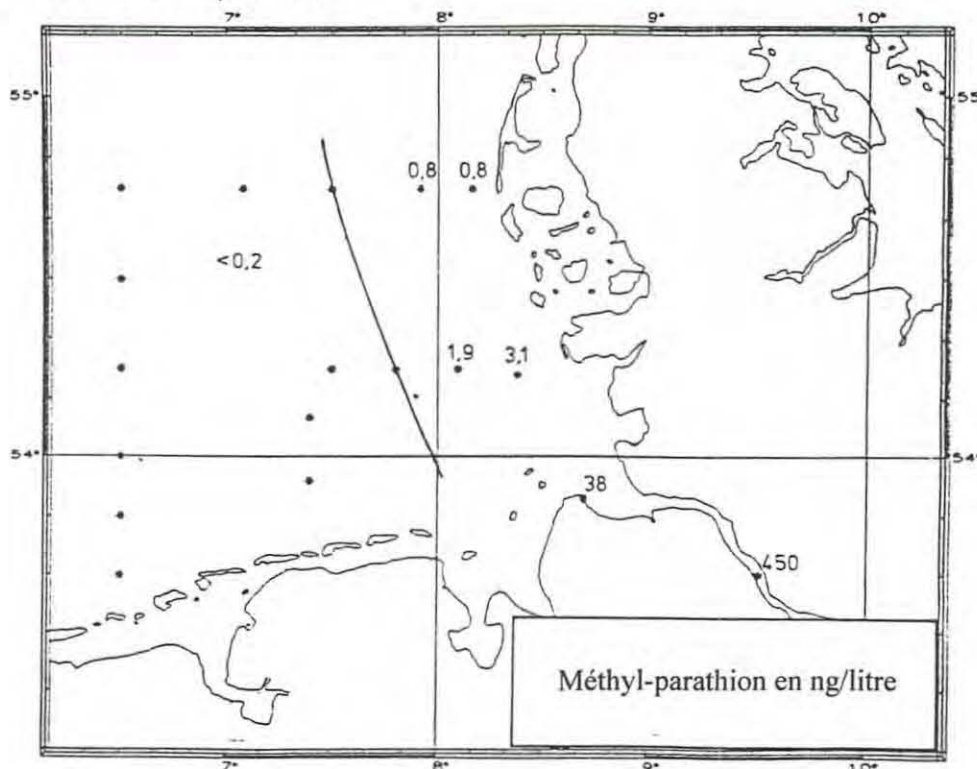


Figure 23 : Niveaux de concentrations en méthyl-parathion (en ng/l) dans le German Bight en Janvier 1987 (d'après l'Institut Hydrographique Allemand).

Il est intéressant de noter que les activités des systèmes de détoxification, particulièrement les activités EROD, sont associées à l'inhibition des cholinestérases sur les premières stations. Les mesures d'activités EROD sont données par le tableau 22 pour les stations 3, 5, 7, 8 et 9. Eggens et al.(1992)

corrèlent ces inductions EROD avec la présence des PCBs dans le foie de limande. La majeure partie des congénères de PCBs testés (12 sur 13) donnent un coefficient de corrélation compris entre 0.96 et 1 ($p < 0.001$).

Station	EROD
3 (n = 8)	354 ± 210
5 (n = 8)	319 ± 382
7 (n = 6)	61.9 ± 19.8
8 (n = 7)	38.8 ± 21.7
9 (n = 4)	136 ± 85.5

Tableau 22 : Niveaux d'activités de détoxification EROD dans le foie de limandes capturées dans le German Bight (d'après Renton et Addison, 1990).

Les activités spécifiques EROD sont exprimées en pmoles de substrat éthoxyrésorufine hydrolysées par minute et par mg de protéine.

Durant cette étude, des dosages des contaminants majeurs suivants : métaux lourds, PCBs, hydrocarbures aromatiques et pesticides organochlorés ont été effectués dans le sédiment et le muscle de limande sur chacune des stations. Toutes ces données ont été comparées à la mesure des activités AChE grâce à l'application du coefficient de Spearman qui chiffre l'intensité de la liaison entre les deux variables activité AChE/contaminant. Cette méthode non paramétrique présente l'avantage de ne nécessiter aucune hypothèse particulière sur la distribution des données. L'application du test de Spearman consiste dans un premier temps à ranger les deux séries de valeurs (activité AChE et concentrations en contaminant) et le coefficient des rangs de Spearman, r_s est donné par l'équation suivante:

$$r_s = 1 - \frac{6 \sum D^2}{n(n^2 - 1)}$$

où D est la différence de rang dans chaque paire et n est le nombre de paire (7 stations donc 7 paires de données pour chaque contaminant.)

L'application de ce test à l'ensemble des données de la chimie a permis de mettre en évidence une relation forte entre les activités AChE de limande et les concentrations en mercure ($p < 0.01$) et les concentrations en cadmium ($p < 0.05$) dans le sédiment (fig. 24 et 25). Les concentrations de ces contaminants dans le muscle de limande ne suivent pas le même comportement et la distribution de ces métaux dans le poisson est relativement homogène sur tout le gradient (fig.24 et 25). Les concentrations en hydrocarbures totaux dans le sédiment suivent le gradient. Les données relatives aux composés organiques dans la matière vivante montrent soit une décroissance de la contamination à partir de la terre, c'est le cas du lindane (insecticide organochloré) et des PCBs soit une répartition à peu près homogène sur l'ensemble des stations pour le ppDDE, métabolite du DDT et la dieldrine.

En réalité la majeure partie des données chimiques concernant le sédiment confirment l'existence d'un gradient décroissant de contamination à partir de l'estuaire vers le Dogger Bank en notant que cette zone est sensiblement plus contaminé que les stations 7 et 8. Les données mesurées dans la matière vivante montrent toute la complexité de la biogéochimie des contaminants en milieu marin qui doit prendre en compte la spéciation chimique de chaque molécule, sa biodisponibilité et sa bioaccumulation sous forme active ou inerte.

En conclusion on peut affirmer qu'il existe une corrélation mesurée entre les concentrations en mercure et en cadmium et les activités cholinestérasiques mais que cette relation sous entend en réalité une corrélation entre la contamination globale du sédiment du German Bight Transect et les activités cholinestérasiques des animaux qui y sont capturés et que les niveaux d'activité de ces enzymes sont inversement corrélés à l'intensité de la pollution. En revanche il n'est pas possible d'attribuer à une famille particulière de composés les effets mesurés en l'absence de données précises sur le niveau de présence des composés organophosphorés et carbamates.

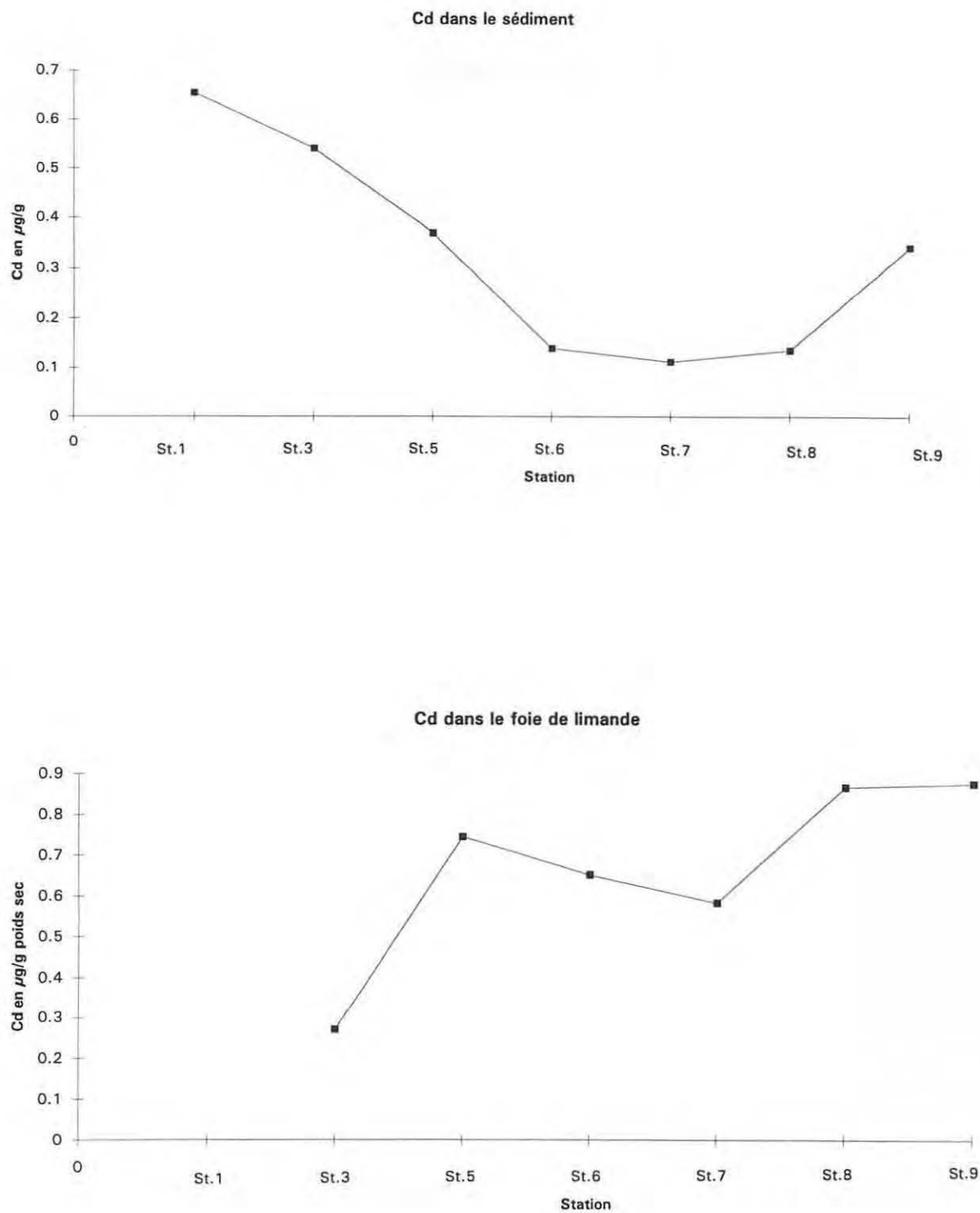


Figure 24: Concentrations en cadmium (en $\mu\text{g/g}$) dans le sédiment et dans le foie ($\mu\text{g/g}$) de limandes du German Bight Transect.

Les concentrations sont mesurées dans la fraction sédimentaire $< 63 \mu\text{m}$.

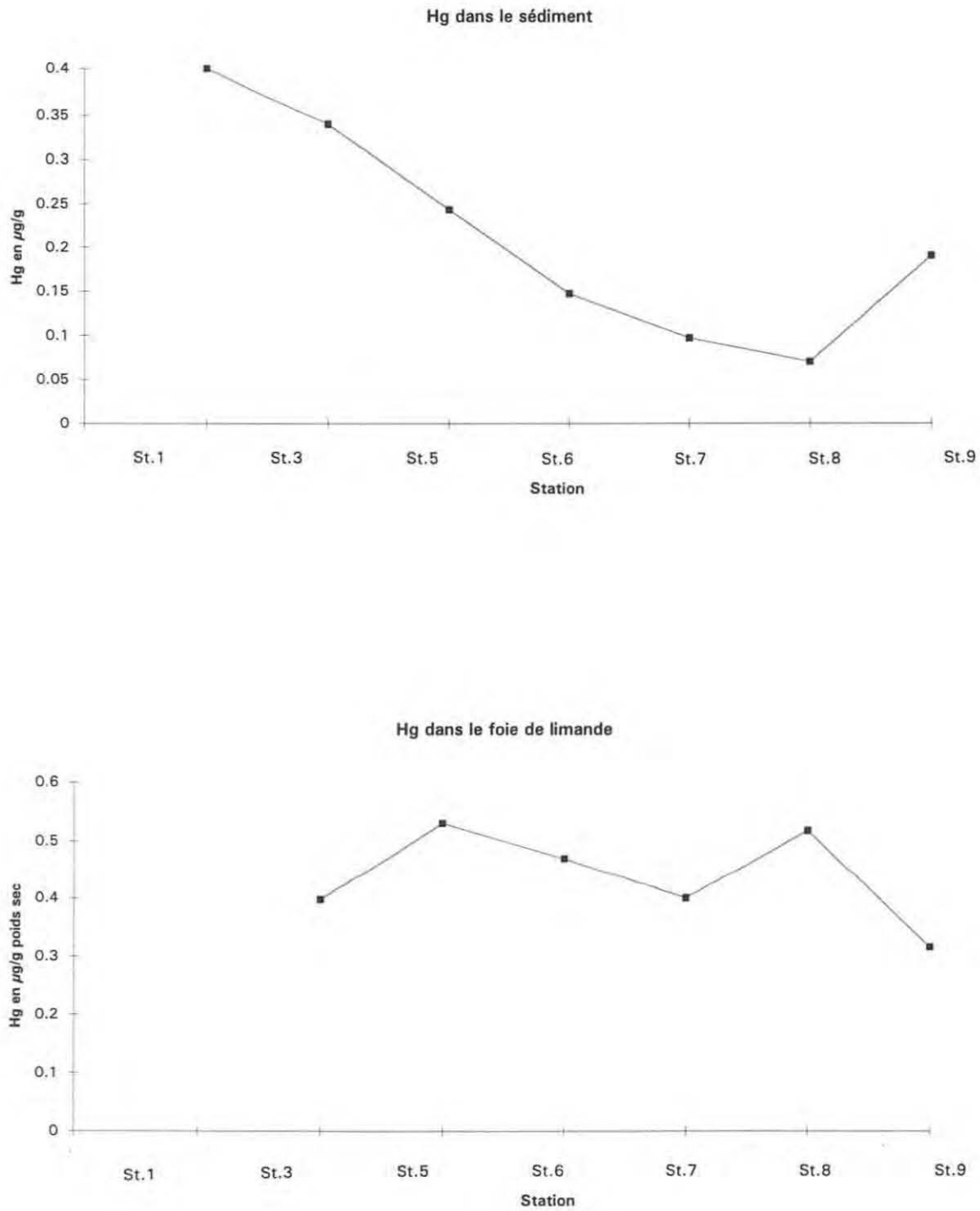


Figure 25 : Concentrations en mercure dans le sédiment ($\mu\text{g/g}$) et dans le foie ($\mu\text{g/g}$) de limandes du German Bight Transect.

Les concentrations sont mesurées dans la fraction sédimentaire $<$ à $63 \mu\text{m}$.

3-2. Mesure des activités AChE chez le callionyme en Baie de Vilaine

3-2-1. La baie de Vilaine

Le bassin versant de la Baie de Vilaine représente près du tiers de la superficie de la Bretagne avec 10 400 km² réparti sur quatre départements. De nombreux canaux et rivières alimentent la Vilaine, notamment l'Oust qui représente un bassin versant important (4 138 Km²) et le Canal de Nantes à Brest. Cette région est caractérisée par des activités agricoles intenses et les apports de composés chimiques liés à ces activités sont importants. La baie de Vilaine est caractérisée par le mélange des eaux douces du fleuve et des eaux marines de l'Atlantique dans une zone où la dérive des masses d'eau est faible et le temps de renouvellement des eaux de la Baie est compris entre 10 et 15 jours ce qui est relativement long. Ce phénomène est dû à la fois à la topographie locale (baie) et à la faiblesse des courants de marée (Chauvin, 1993).

Une campagne de pêche visant à recenser les populations de larves et juvéniles de soles sur cette zone a été l'opportunité de récolter des espèces benthiques dont le callionyme. Les prélèvements ont été réalisés sur des stations très proches les unes des autres contrairement à l'étude engagée en Mer du Nord où les sites de pêche étaient distants les uns des autres de 10 à 20 miles (\cong 18.5 à 37 km) sur une longueur totale de 200 miles (\cong 320 km). En baie de Vilaine les stations de prélèvement ne sont séparées que par 1 à 2 miles et l'ensemble de la zone prospectée mesure 10 x 10 miles (10 miles \cong 18.5 km).

3-2-2. Choix du callionyme et niveaux d'activité des cholinestérases chez cette espèce en Baie de Vilaine

Le vocabulaire cité pour désigner une espèce choisie pour le contrôle de paramètres biologiques est vaste et on parlera tour à tour, d'espèce-cible ou encore d'espèce sentinelle mais il semble que le terme d'espèce bioindicatrice est le plus significatif à cet égard. Le choix de cette espèce répond à un certain nombre de critères propres à simplifier l'interprétation des éventuels effets observés. On donnera donc priorité aux espèces benthiques, définies comme vivants sur ou dans le sédiment, les espèces à vie sédentaire qui reflèteront mieux les caractéristiques de la zone où ils sont capturés et les espèces à large répartition géographique de manière à ce que des comparaisons par zone puissent être opérées. En réalité le choix est extrêmement restreint et se limite à quelques espèces de poissons plats notamment la plie (*Pleuronectes platessa*) et la limande

(*Limanda limanda*) en Manche et Mer du Nord. Deux autres espèces benthiques répondent à ces contraintes : le rouget barbet (*Mullus barbatus*) en Méditerranée et le callionyme ou dragonnet (*Callionymus lyra*) présent dans 90% des chalutages en Atlantique. Le callionyme présente des cholinestérases très sensibles aux inhibiteurs (voir 2-4-2-1).

La stratégie de prélèvements des callionymes est guidée par la couverture de la zone de panache de la Vilaine en mer. Neuf stations ont été prospectées et sur chacune d'elles 10 callionymes ont été retenus après des périodes brèves de chalutage (5 minutes). Les animaux prélevés vivants sont de taille homogène entre 16 et 18 cm, ce qui correspond à des animaux âgés de 3 à 4 ans, et de sexe mâle. Les activités AChE sont mesurées sur le cerveau et sur le muscle dorsal pour chacun des échantillons selon la méthode d'Ellman décrite précédemment (voir 1-3-1-2.). Les activités AChE spécifiques dans le cerveau sont présentées sur la figure 26.

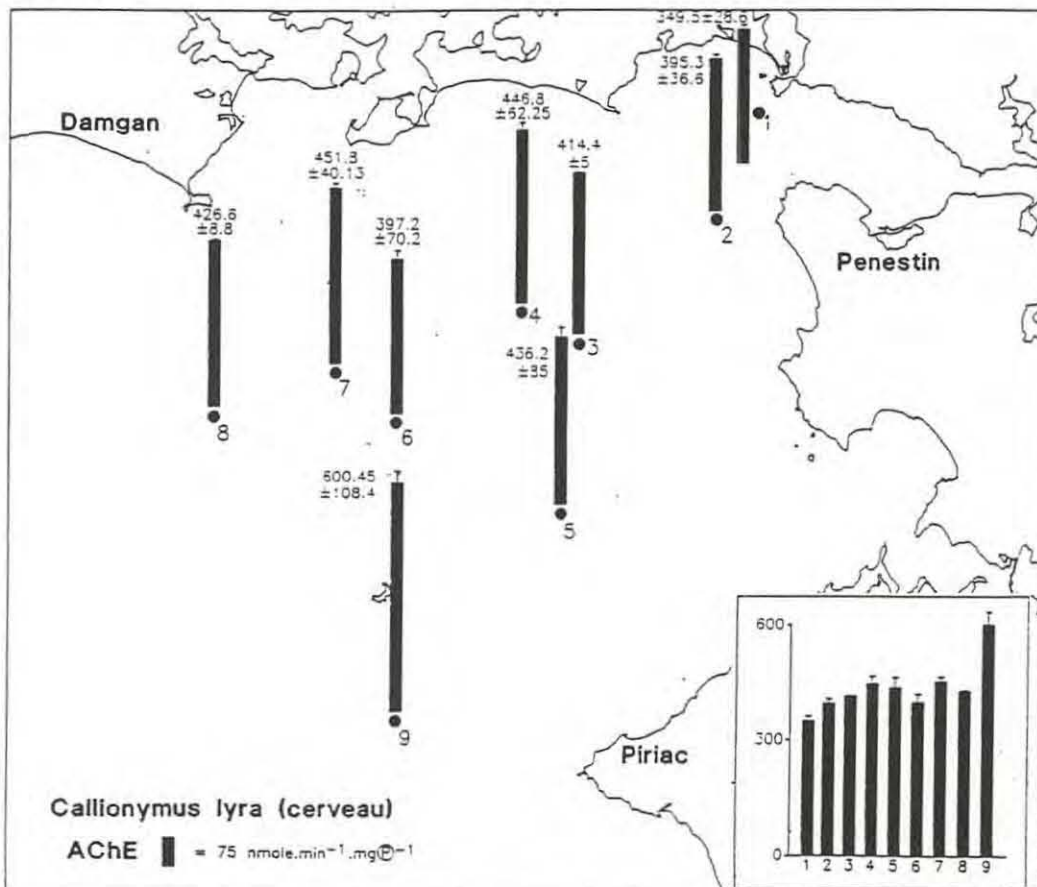


Figure 26 : Hydrolyse de l'AcSCh dans le cerveau de callionymes capturés dans la baie de Vilaine

L'hydrolyse est exprimée en nmoles de substrat hydrolysées par minute et par mg de protéine. Les valeurs sont la moyenne ± E.T. de 4 déterminations.

Ils permettent de mettre en évidence des différences importantes en niveau d'activité entre les animaux capturés dans l'embouchure du fleuve (station 1) et ceux capturés au large au sud de l'île Dumet (station 9). La différence est très significative ($p < 0.001$) entre les deux populations et la diminution de l'activité AChE sur la station 1 est de 58% de l'activité mesurée sur la station 9. D'autre part il est facile au vu de ces mesures de visualiser l'impact de la Vilaine et de la dilution des apports grâce à l'augmentation progressive des activités à partir de la station 1. Ce type de réponse est semblable en profil à celui obtenu sur la radiale de Mer du Nord. Mais ces données ne sont pas du tout confortées par les niveaux d'activités AChE mesurés sur le muscle des mêmes individus (figure 27). En effet aucune différence significative n'apparaît dans les valeurs obtenues à partir des extraits musculaires.

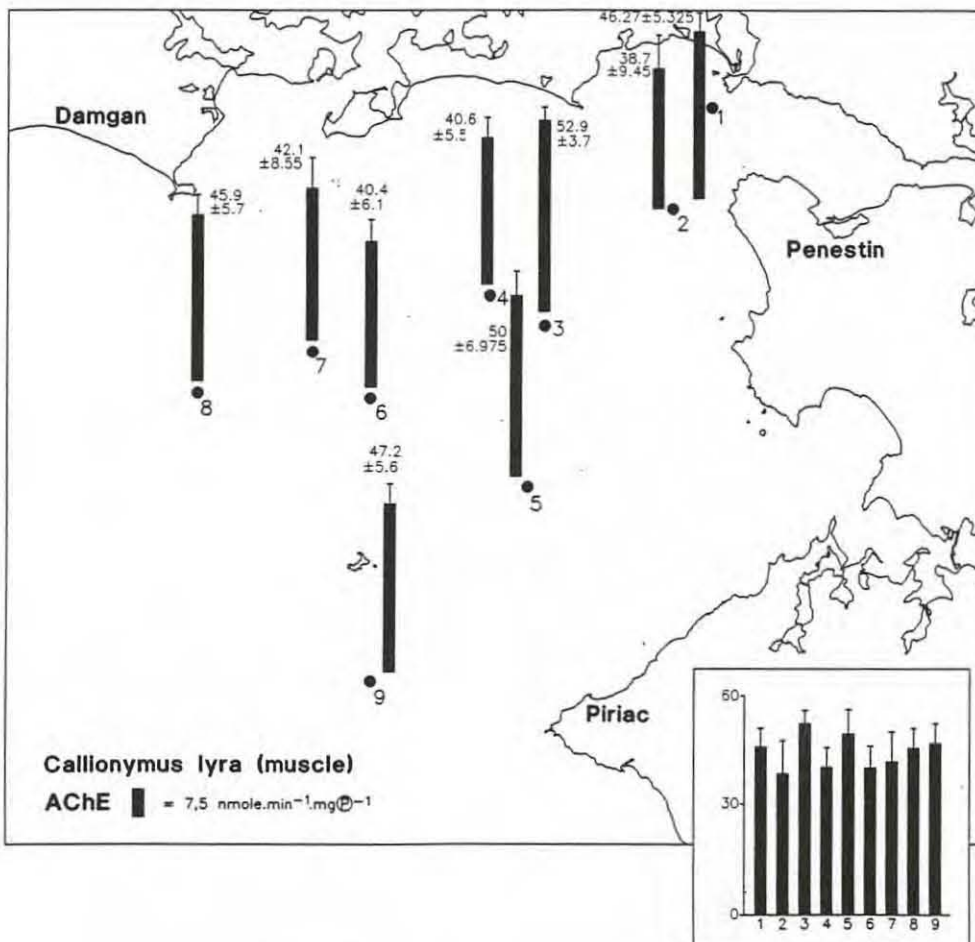
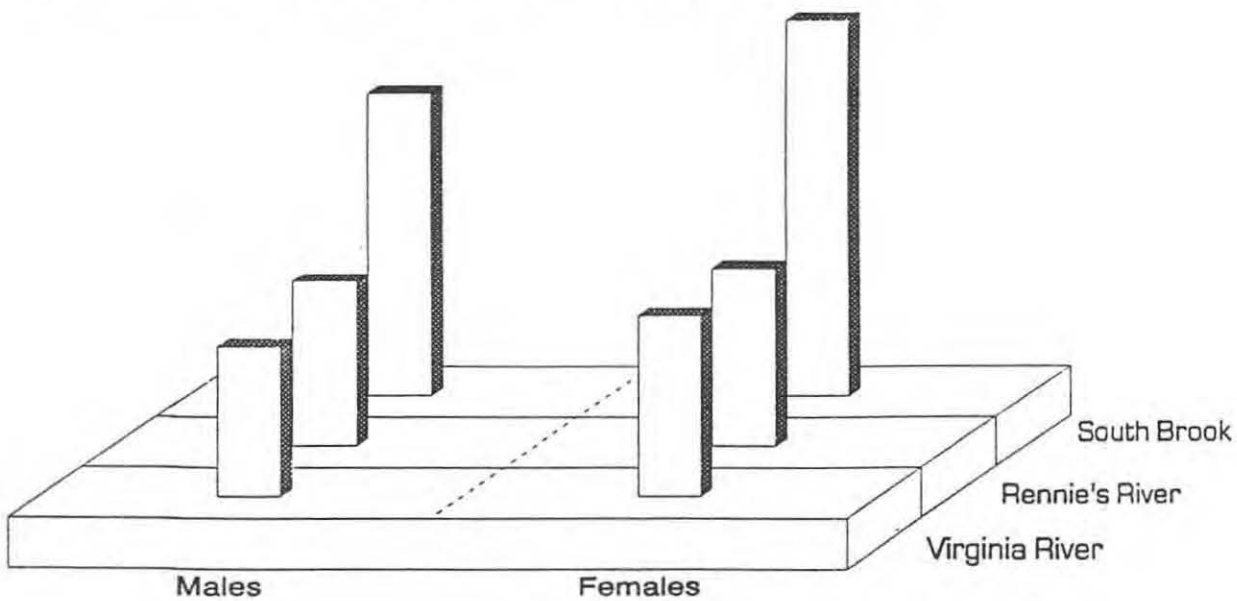


Figure 27 : Hydrolyse de l'AcSCh dans le muscle dorsal de callionymes capturés dans la baie de Vilaine.

L'hydrolyse est exprimée en nmole de substrat hydrolysées par minute et par mg de protéine. Les valeurs sont la moyenne ± E.T. de 4 déterminations.

Ce constat amène plusieurs questions importantes relatives à la cinétique de la réponse des organismes aux polluants en fonction de l'organe étudié. Si on s'intéresse aux valeurs de cholinestérasés du cerveau on observe qu'elles permettent de localiser des populations distinctes qui, a priori, ne sont pas mélangées puisqu'on peut différencier les animaux de la station 1 de ceux de la station 9, séparés d'une dizaine de miles et capturés à 12 heures de décalage. Cela pourrait signifier que la réponse à une exposition aux inhibiteurs serait plus rapide dans cet organe. Différents organes ont été utilisés par de nombreux auteurs pour contrôler l'effet des inhibiteurs chez le poisson et les avis sont partagés sur l'avantage de l'un ou l'autre.

Si de manière générale le cerveau présente de plus fortes activités cholinestérasiques que le muscle ou tout autre organe, plusieurs facteurs limitent son utilisation en routine sur de larges séries d'échantillons. Le prélèvement du cerveau est plus délicat que celui du muscle et surtout la quantité de matière obtenue à partir du cerveau est faible. Les informations sur la sensibilité comparée aux OP et C entre organes d'une même espèce sont rares. Yawetz et al.(1993) soulignent la plus grande sensibilité des branchies comparées au cerveau chez le tilapia et la carpe soumis à plusieurs OPs et Cs.



0.956 ± 0.043	1.184 ± 0.073	South Brook
0.523 ± 0.043	0.565 ± 0.056	Rennie's River
0.472 ± 0.027	0.569 ± 0.037	Virginia River

Figure 28 : Hydrolyse de l'AcSCh par des extraits musculaires de truites capturées dans trois rivières canadiennes (d'après Payne et al., 1994).

Les activités sont exprimées en μ moles de substrat hydrolysées par minute et par mg de protéine. South Brook est considérée par les auteurs comme site de référence.

Les résultats des travaux de Payne et al. (1994) sur des truites prélevées dans trois rivières canadiennes sont différents des nôtres. Payne observe des différences importantes entre les activités AChE musculaires de truites capturées dans deux rivières urbaines et les mêmes activités d'animaux prélevés dans une rivière considérée comme référence mais que seule répond aux contaminants l'acétylcholinestérase extraite du muscle (-50% d'activité dans les cours d'eau contaminés) alors qu'aucune différence n'est mesurable à partir des cholinestérases de cerveaux extraites des mêmes animaux (fig. 28).

On se trouve en Baie de Vilaine dans la situation contraire et dans l'impossibilité, compte tenu de l'état de nos connaissances, d'attribuer une signification à ces variations. L'étude de la distribution des inhibiteurs dans les différents organes et de l'influence du temps d'exposition sur cette distribution et d'autres campagnes de prélèvement devraient permettre de mieux comprendre ces variations.

3-3. Mesure des activités AChE chez le poisson chirurgien *Acanthurus bahianus* en Martinique

3-3-1. Utilisation des insecticides sur l'île de la Martinique

La Martinique est une petite île des Caraïbes qui mesure 80 kms de long sur 30 kms de large et couvre 1090 km². Les cultures de la banane, de la canne à sucre et de l'ananas sont les principales ressources agricoles du département et ce développement n'a été rendu possible sur cette île au climat tropical que par l'usage massif de produits phytosanitaires. La température moyenne de la Martinique avoisine les 30°C et l'atmosphère est totalement saturée en eau. Cette chaleur humide est propice au développement constant de populations d'insectes et de nématodes parasites qui constituent un danger permanent pour les cultures notamment les cultures fruitières.

Ce contexte peut justifier l'importation de 2 894 tonnes de produits phytosanitaires en 1990 dont 2 219 tonnes d'insecticides (Cooper, 1992) soit 2 tonnes/km². Pour comparaison, la consommation métropolitaine est de l'ordre de 0.012 tonne/km². A l'échelle du département, la consommation de ces produits est énorme puisqu'il ne mesure que 1/550^{ème} de la métropole et sa consommation d'insecticides est égale au 1/3 de celle-ci ! De plus, la grande majorité des molécules utilisées appartient aux familles des carbamates et des organophosphorés. La culture de la banane est la plus grande consommatrice d'insecticides et en particulier de nématicides. Les bananeraies sont plutôt concentrées sur le Nord-Est et le Centre-Est de l'île.

La mission "cholinestérase" avait pour objectif d'aborder les problèmes écotoxicologiques du littoral de la Martinique en vue de mettre en évidence des effets de polluants sur les organismes marins et de caractériser les zones d'effets écotoxicologiques en Martinique en rapport avec la consommation d'insecticides. Le choix du site d'étude s'est aussi porté sur l'île de la Martinique en raison de la présence d'une infrastructure l'Ifremer sur l'île permettant de réaliser ce type d'étude dans les meilleures conditions.

Les travaux ont porté sur des mesures *in situ* de cholinestérase et des analyses *in vitro* d'inhibition des cholinestérase en vue de mettre en évidence d'éventuels effets de ces insecticides sur les espèces locales.

3-3-2. Activités AChE chez *Acanthurus bahianus*.

Les poissons chirurgiens de l'espèce *A. bahianus* ont été capturés sur les récifs coraliens de neuf stations du littoral de l'île à l'aide de nasses maintenues sur zones pendant 48 à 72 heures. Les acanthuridés sont des espèces herbivores et détritivores totalement inféodés au récif dont elles ne s'écartent pas ; le contenu digestif de ces poissons laisse apparaître un pourcentage important de sédiments utilisés pour le broyage des fibres végétales. En ce sens les poissons chirurgiens se présentent comme de bons bioindicateurs. Cinq à neuf individus de taille homogène (14-18 cm) mais de sexe indéterminé sont prélevés sur chacune des neuf stations.

Les mesures d'activité AChE sont réalisées à partir du muscle dorsal des poissons suivant les techniques décrites précédemment (voir 1-3-1-2.). Les sédiments utilisés pour les tests d'inhibition des cholinestérases *in vitro* ont été prélevés sur les parties immergées des plages ou à l'embouchure des rivières sur 40 zones distinctes. Les analyses ont été réalisées dans le laboratoire de l'Ifremer Martinique grâce au matériel importé de métropole. Les mesures d'inhibition *in vitro* sont obtenues à partir de l'incubation pendant 2 heures d'extraits aqueux des sédiments des 40 stations avec un extrait enzymatique réalisé sur un pool de cholinestérases de *A. bahianus* pêchés sur la station 1, la plus au large.

Les analyses d'inhibition *in vitro* des cholinestérases ne montrent pas de différences significatives entre les 40 stations de l'ensemble du littoral martiniquais. Ce manque de résultats peut être attribué à une mauvaise stratégie d'échantillonnage puisque les prélèvements de sédiments ont été faits à partir de la côte sur la zone la plus balayée de l'estran, là où les courants et les lames sont les plus puissants et où le sédiment est le plus lavé. Un meilleur plan d'échantillonnage aurait consisté à prélever en mer, dans les baies particulièrement fermées de la côte atlantique, des échantillons de sédiments là où ils déposent dans des zones de non turbulence. Mais ce type de prélèvement implique de disposer d'une embarcation et de matériel spécifique.

Les analyses de l'activité des cholinestérases de muscles de *Acanthurus bahianus* montrent des différences significatives entre la plupart des sites de prélèvements (figure 29).

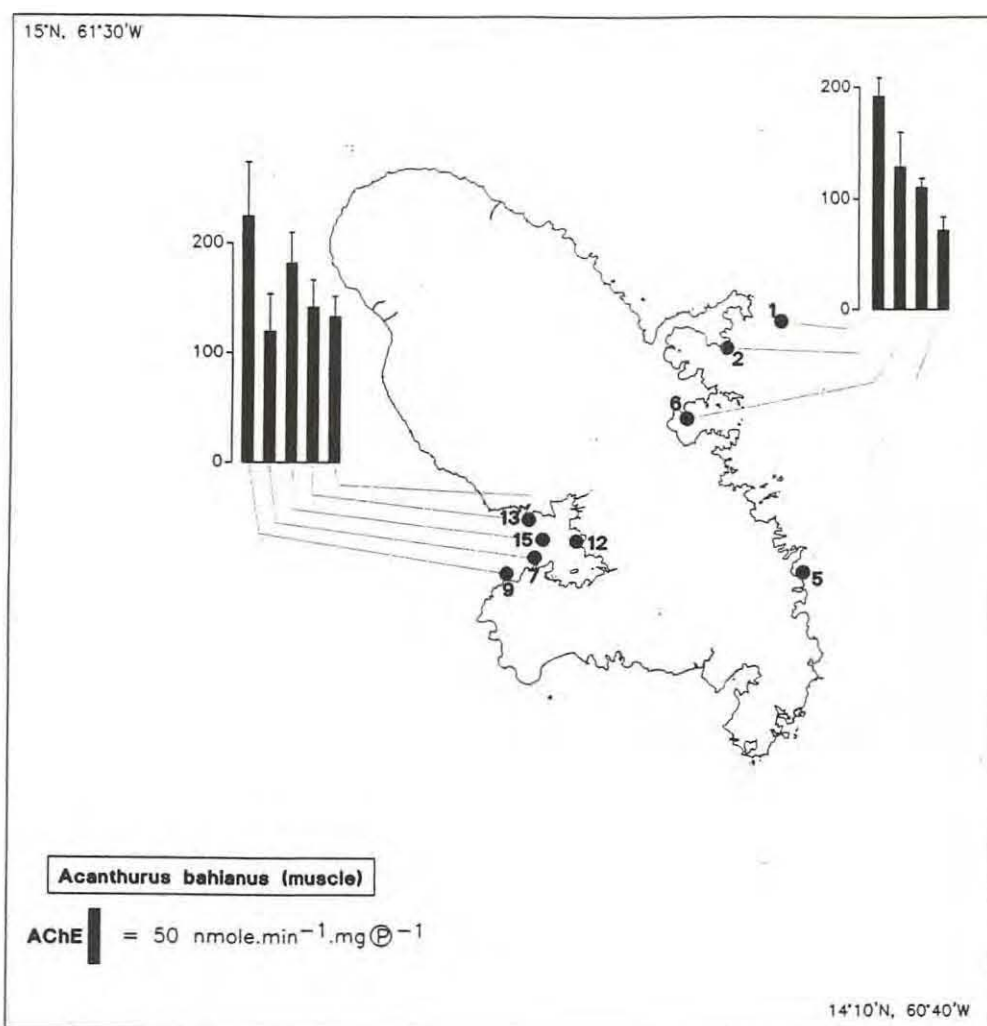


Figure 29 : Hydrolyse de l'AcSCh par des extraits de muscle dorsal de *Acanthurus bahianus* sur 9 stations du littoral martiniquais.

Les activités AChE sont exprimées en nmoles de substrat hydrolysées par minute et par mg de protéine. Les valeurs sont la moyenne \pm E.T. de 4 déterminations.

Bilan sur la côte atlantique (fig.29).

La station 1, située au large de la Caravelle et considérée par sa position au large comme site de référence, présente les activités les plus élevées. Les activités AChE sont particulièrement basses sur la station 5 située dans l'anse du Vauclin et significativement différentes de la station de contrôle 1 mais aussi des stations 2 et 6 ($p < 0.001$) situées respectivement à la pointe Brunel et à la pointe du Fort. Mais ces deux dernières stations présentent aussi des activités significativement plus basses que celles de la station 1 ($p < 0.001$). La différence en niveau d'activité

atteint 60% entre les stations 5 et 1, 43% entre les stations 6 et 1 et 34% entre les stations voisines 2 et 1.

Bilan sur la côte caraïbe (fig.29).

Dans la Baie de Fort-de-France, la station 9 de l'îlet du Ramier montre les activités les plus fortes alors que les sites 7, 12 et 13 montrent les activités les plus faibles

Les différences de niveau d'activité AChE mesurées sur les stations de la côte Est, notamment à Vauclin suggèrent des effets liés à la présence de pesticides et, bien que les données chimiques ne soient pas plus disponibles pour cette région que pour la métropole, plusieurs témoignages obtenus auprès des pêcheurs vont dans ce sens. Des mortalités accidentelles ont été observées sur des élevages d'IFREMER et dans des stations d'aquaculture de l'île et les symptômes présentés par les organismes sont caractéristiques des effets des neurotoxiques de type anticholinestérasique. Plusieurs pêcheurs nous ont signalés des mortalités de poissons dans les nasses en relation avec l'épandage d'insecticides sur les bananeraies et des problèmes d'allergie et de démangeaisons que subissent des baigneurs et des pêcheurs après le passage d'hélicoptères chargés de la dispersion de ces produits.

La très forte consommation d'insecticides dans cette région et les problèmes liés à leur utilisation ont déjà été évoqués par le passé. Kempf (1988) signale des contaminations par le DDT dans les poissons 3 à 30 fois supérieures à ceux capturés en Méditerranée or le DDT bien qu'il ne soit plus autorisé est un bon indice de l'utilisation des insecticides dans une région. Les organophosphorés et les carbamates se sont substitués aujourd'hui aux molécules organochlorés et Cooper (1992) signale des consommations en OP notamment en terbufos, éthoprophos, izasophos et phénamiphos supérieures à 10 tonnes par molécule et par an. Les carbamates aldicarbe et carbofuran sont dispersés à raison de 5 à 10 tonnes par molécule et par an. Le problème de l'utilisation massive d'insecticides n'est pas propre à cette île puisqu'en Guadeloupe la consommation atteint 2 050 tonnes (1.2 tonne/km²) et 950 tonnes (2.2 tonnes/km²) à la Barbade. En réalité la surconsommation d'insecticides est vraie pour l'ensemble des Caraïbes et de l'Amérique centrale.

3-4. Etude de l'écotoxicité de boues de dragage et suivi des dépôts

Les sédiments portuaires sont lieux de piégeage de tous les contaminants transformés ou complexés sur les particules solides auxquels se rajoutent tous les rejets liés aux activités portuaires. Ces boues qui reflètent souvent des décennies de contamination sont régulièrement rejetées en mer avec des risques importants d'effets toxiques sur la faune et la flore marines. La convention d'Oslo, signée en 1992, prévoit de procéder à l'évaluation du risque et des impacts quand d'importantes quantités de ces boues sont déplacées. A l'initiative du groupe français GEODE qui a en charge le suivi de ces problèmes, une étude multimarqueurs (EROD, AChE et spermioxicité) a été engagée sur trois sites de rejet de boues de dragage des ports de Calais, Le Havre et St Nazaire. L'objectif de ce suivi est de déterminer l'impact biologique des sédiments dans les zones de dépôt par comparaison avec des zones non exposées.

3-4-1. Matériels et méthodes

Effets des rejets sur l'activité AChE in situ et in vitro

L'étude de l'activité AChE peut permettre la mise en évidence de variations de l'activité liées à la présence d'inhibiteurs dans le milieu. Deux types d'étude ont été engagés dans le suivi des effets de relargage de boues de dragage:

- - l'analyse de l'activité AChE a été entreprise sur le muscle de poissons capturés sur ou à proximité des sites de relargage. Les mesures en niveau d'activité ont été comparées aux activités de la même espèce sur une zone distincte du site de rejet.
- - après incubation de différentes dilutions de l'extrait aqueux obtenu à partir du sédiment (boue) avec deux extraits enzymatiques de poissons (qui contiennent l'AChE), des mesures d'activité ont permis la recherche d'éventuels effets inhibiteurs de contaminants.

Les mesures ont été réalisées sur deux espèces benthiques selon leur disponibilité sur zones : la sole (*Solea solea*) sur les zones Gironde et estuaire de Loire et le callionyme (*Callionymus lyra*) sur les zones estuaire de Loire et Baie de Seine.

Dix poissons sont pêchés par chalutage de 30 minutes sur chaque station. Chaque individu est mesuré et sexé. Les muscles sont extraits, rincés dans un premier tampon (Tris 0.1M, pH 7.8) et conservés dans l'azote liquide.

Les muscles sont broyés dans un tampon Tris 0.1M, pH 7.8 et centrifugés à 10 000g pendant 30 minutes. Le surnageant est directement utilisé pour la mesure de l'activité cholinestérasique. La méthode d'Ellman (1961) modifiée pour une utilisation de systèmes microplaques est appliquée à la mesure de l'activité AChE (voir 1-3-1-2.). L'activité spécifique est obtenue après dosage des protéines totales selon la méthode de Bradford. Cette mesure est obtenue pour chaque individu capturé sur les différents sites.

Les extraits aqueux issus des boues relarguées sont obtenus à partir de la suspension de 100 g de chacune des boues dans 1 litre d'eau de mer filtrée à 0.22μ et sont agités pendant 12 heures. Après décantation pendant trois heures, différentes dilutions du surnageant (1/2, 1/4, 1/10 et 1/50) correspondant à 50, 25, 10, 2 g/l sont préparées. Ces extraits sont mis en incubation pendant 4 heures à température ambiante (22°C) avec des extraits très dilués de muscle de callionymes et de sole à respectivement 1.8 et 1.3 mg de protéine par ml d'extrait et les concentrations en réactifs sont adaptés à une lecture de cinétique longue (acétylthiocholine à $260\mu\text{M}$ finale et DTNB à $50\mu\text{M}$ finale). La mesure de l'activité est lancée par l'introduction du substrat et la cinétique est suivie pendant 60 minutes.

3-4-2. Résultats et discussion

Activités AChE in situ.

Les résultats sont donnés par les figures 30 et 31.

Les activités AChE des poissons prélevés à des saisons différentes ne sont pas comparables entre elles. Les paramètres environnementaux tels que la température du milieu influent sensiblement les niveaux d'activité. Les prélèvements sur une même zone doivent être simultanés et la température de l'eau de mer contrôlée.

Baie de Seine (fig.30).

La mesure des activités AChE de callionymes capturés dans la Baie de Seine met en évidence des activités significativement plus faibles ($p < 0.01$) sur les stations situées dans l'estuaire même de la Seine ainsi que dans l'estuaire de l'Orne (respectivement 48 ± 2 nmoles/mn/mg P et 47.7 ± 2.2 nmoles/mn/mg P). En revanche les animaux capturés sur la zone de rejets montrent des activités

supérieures aux deux stations précédentes (53.4 ± 2.3 nmoles/mn/mg P) et égales au niveau d'activité mesuré sur la station de référence (53.4 ± 3.1 nmoles/mn/mg P). Aucun effet inhibiteur lié au dépôt n'est évident sur cette zone.

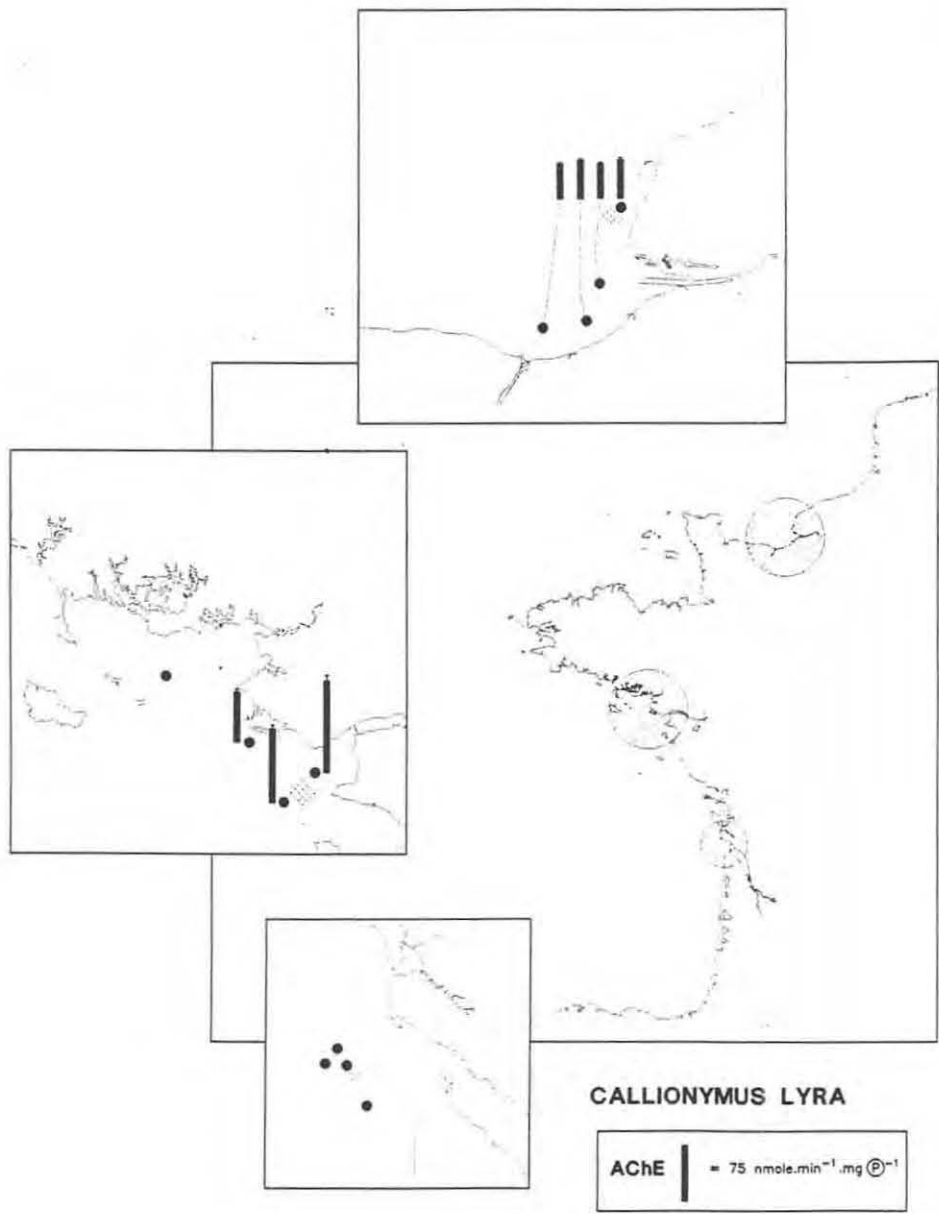


Figure 30 : Hydrolyse de l'AcSCh par des extraits musculaires de callionymes capturés sur et à proximité de zones de dépôts de boues de dragage portuaire en baie de Seine et en estuaire de Loire.

Les activités AChE sont exprimées en nmoles de substrat hydrolysées par minute et par mg de protéine. Les valeurs sont la moyenne \pm E.T. de 4 déterminations.

Estuaire de Loire (fig.30 et 32).

En estuaire de Loire, les callionymes pêchés sur la zone de relargage des boues montrent des activités significativement plus faibles (100.9 ± 17.4 nmoles/mn/mg P) que les animaux capturés plus en amont dans la zone estuarienne (126.9 ± 8.2 nmoles/mn/mg P) ($p < 0.01$).

Ces résultats sont confirmés par les mesures réalisées sur les soles et qui montrent le même profil (respectivement 74.7 ± 8.2 nmoles/mn/mg P et 109.0 ± 12 nmoles/mn/mg P).

La zone de référence située au large du Croisic montre des activités plus faibles chez le callionyme que sur les zones de dépôt.

Les mesures d'activités EROD obtenues sur cette zone montrent une très forte induction du système de détoxification sur la station où les activités AChE sont faibles (fig.31).

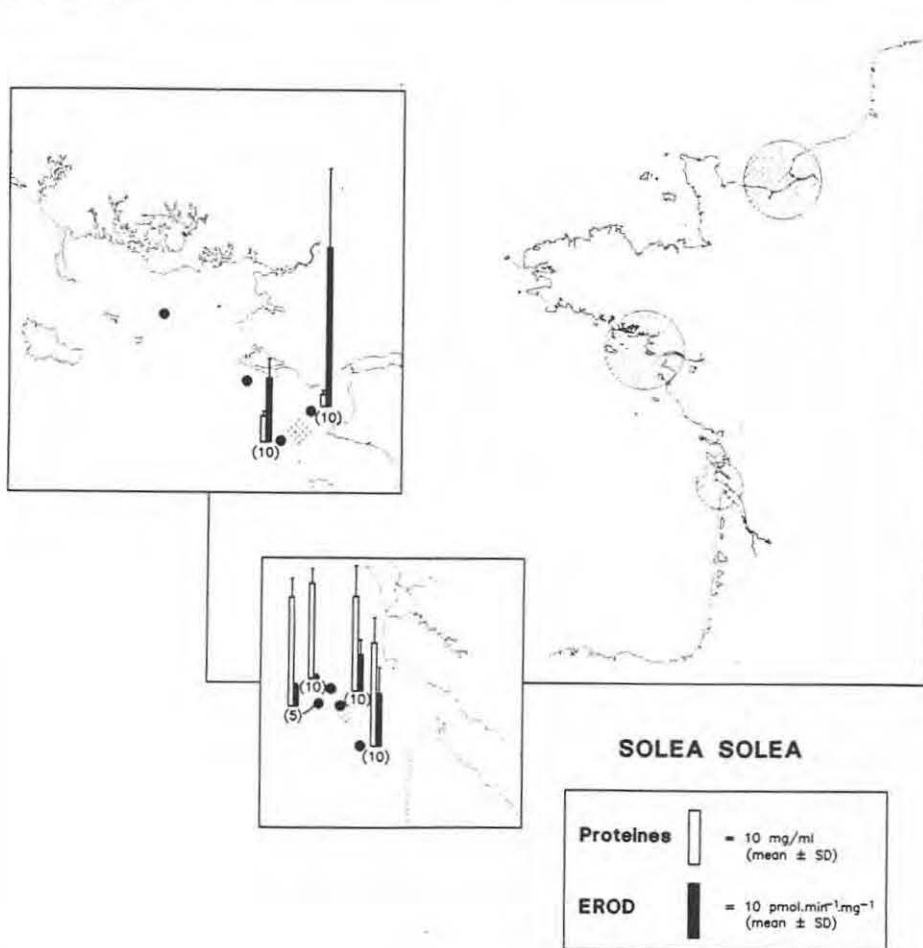


Figure 31 : Niveaux d'activités de détoxification EROD chez la sole prélevée en estuaire de Loire à proximité d'une zone de relargage de boues de dragage portuaire.

Les activités spécifiques EROD sont exprimées en pmoles par minute et par mg de protéine.

Estuaire de Gironde (fig.32).

En estuaire de Gironde, les soles prélevées sur la zone de rejets présentent des activités semblables en niveau aux autres stations de cet estuaire (113.6 ± 26.2 nmoles/mn/mg, 111.8 ± 24.6 nmoles/mn/mg P et 116 ± 5.5 nmoles/mn/mg P) y compris la zone de référence. Une quatrième station située au nord ouest de la zone de dépôt montre des activités plus faibles (90 ± 12.1 nmoles/mn/mg P ($p < 0.01$)). Ces résultats ne permettent pas de suspecter un effet particulier sur cette zone.

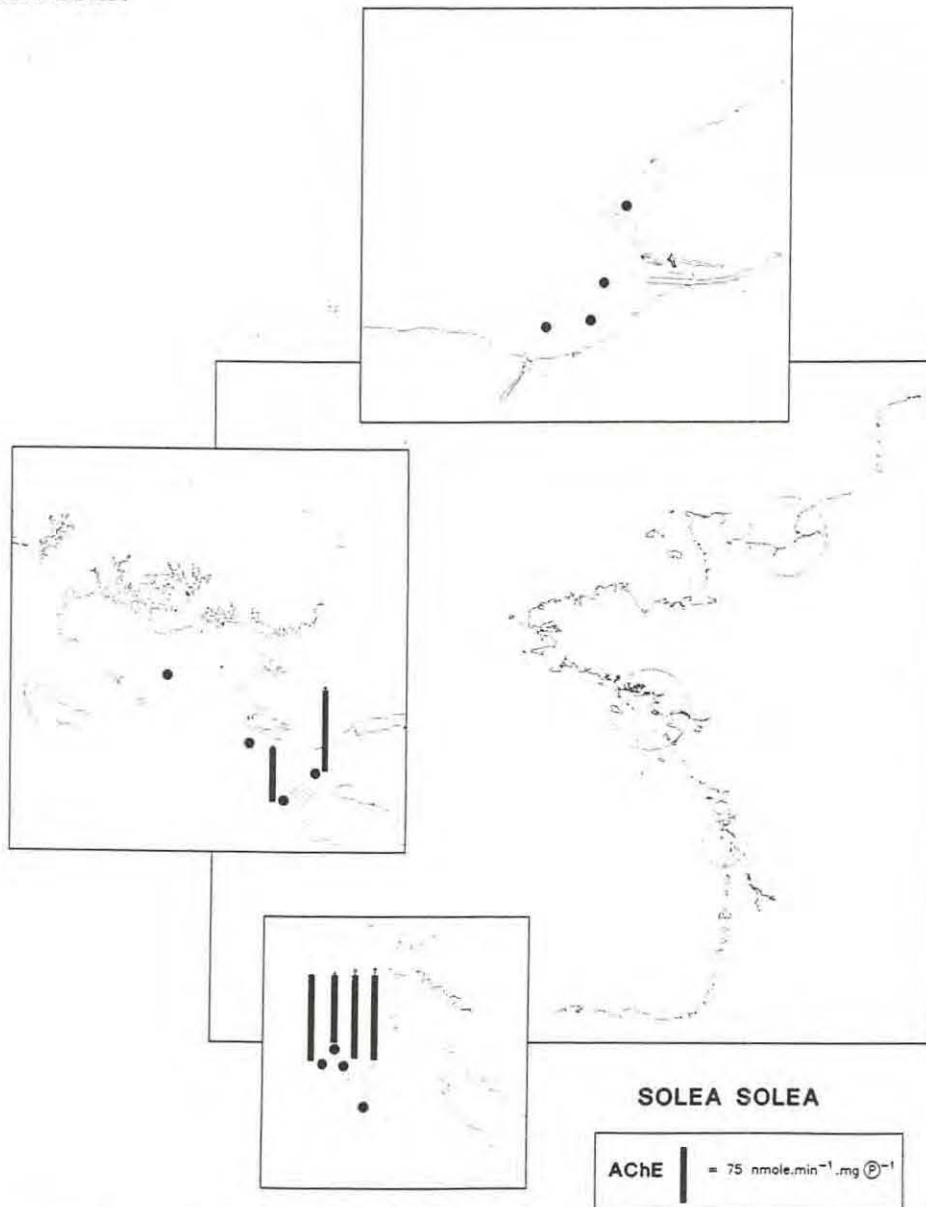


Figure 32 : Niveaux d'activité AChE de soles capturées sur et à proximité de zones de dépôts de boues de dragage portuaire en estuaire de Loire et estuaire de Gironde.

Le choix d'une station de référence est toujours délicat et doit tenir compte des rejets identifiés, des redépôts sédimentaires apportés par les courants et de

l'influence des apports des fleuves. La situation la plus simple est celle d'un gradient linéaire connu à partir de données de la chimie. En dehors de cette situation particulière il est préférable de ne pas localiser une station de référence sur une zone géographique réduite sans connaissance des éventuelles contaminations. C'est tout le sens du terme "zone exempte de pollution" souvent utilisé dans la littérature qui reste à définir.

Effets inhibiteurs *in vitro*

Les résultats donnés par les histogrammes de la figure 33 regroupent les effets des incubations de différentes dilutions d'extraits aqueux obtenus à partir des boues rejetées (100g de boue par litre d'eau de mer filtrée).

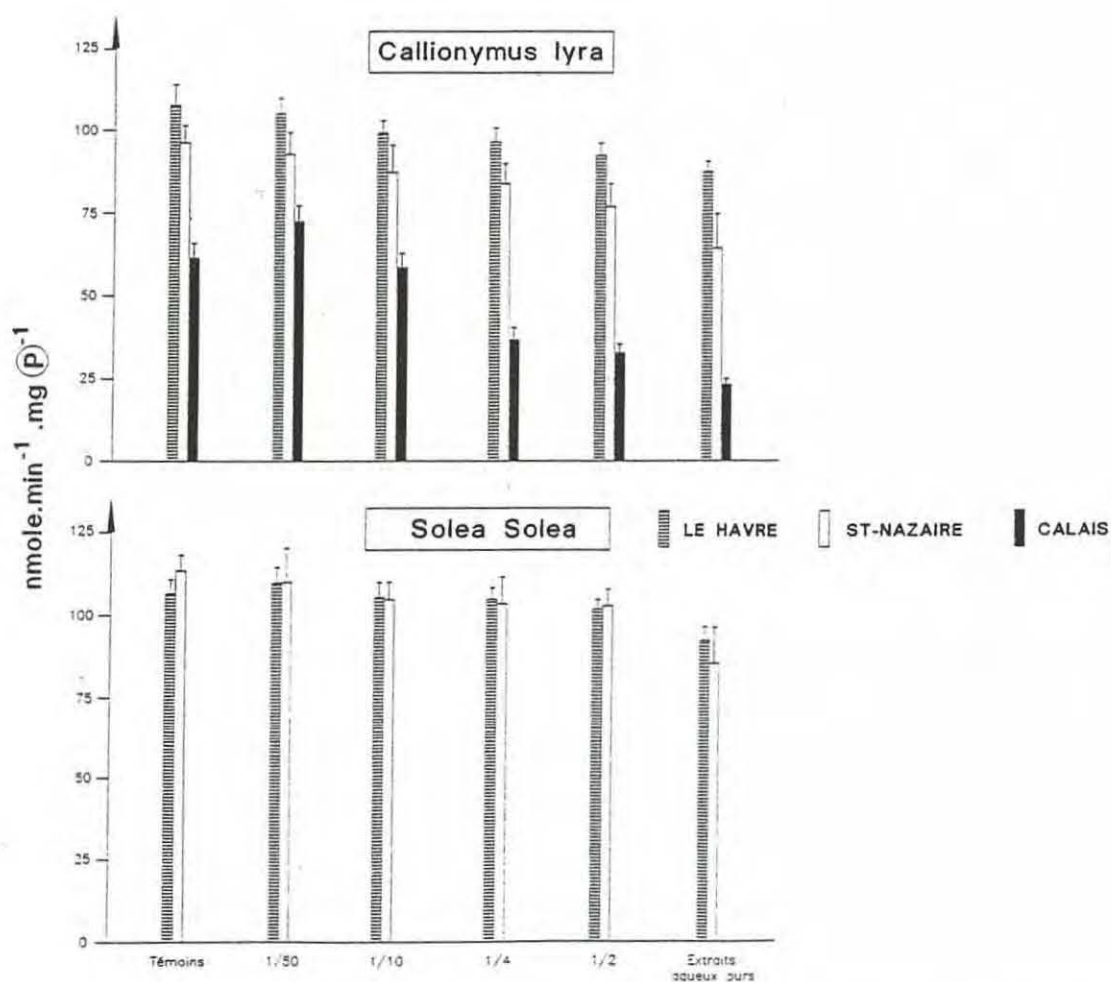


Figure 33 : Effets inhibiteurs *in vitro* sur l'activité AChE de *C.lyra* et *S.solea* de différentes dilutions d'extraits aqueux de boues de dragage prélevées dans les ports de Le Havre, St Nazaire et Calais.

Les activités AChE sont exprimées en nmoles de substrat hydrolysées par minute par mg de protéine.

Les effets inhibiteurs sont sensibles dès la dilution de cet extrait au 1/4 ($\cong 25\text{g/l}$) pour les prélèvements du Havre et de St Nazaire; on constate une inhibition de, respectivement, 10.3% et 12.7% par rapport aux activités AChE de callionymes témoins. Les effets inhibiteurs de l'extrait de Calais sont significativement plus forts et atteignent 41% pour la même dilution. Les extraits purs (100g de boue par litre) montrent les effets les plus forts avec 63% d'inhibition à Calais, 33.3% à St Nazaire et 19% au Havre. Les mêmes essais réalisés sur des extraits enzymatiques de sole révèlent des effets inhibiteurs plus faibles qu'on peut attribuer à la moins grande sensibilité de cette espèce (13.8% au Havre et 25% à St Nazaire avec les extraits concentrés à 100g/l). Les essais sur cette espèce n'ont pas été effectués avec les extraits de Calais.

Dans les trois cas les effets sur les niveaux d'activité de l'acétylcholinestérase sont manifestes mais les effets les plus forts sont observés avec l'extrait de Calais. Pour les mêmes raisons que celles évoquées précédemment (absence de données chimiques sur les insecticides organophosphorés et carbamates dans la couche sédimentaire de ces zones) il est impossibles d'affirmer que ces effets sont exclusivement liés à ces produits mais l'expérience acquise au laboratoire sur les causes des inhibitions des cholinestérases permet de conclure à un effet global de la contamination de l'extrait préparé à partir de 100g/l. Ces informations concernant un effet inhibiteur marqué mais obtenu *in vitro* ne permettent pas de prédire un effet semblable dans le milieu, l'effet de dilution de la masse d'eau est probablement très supérieur à 100g/l en mer et cette concentration parait peu probable dans le milieu.

Les tests de spermiotoxicité sont effectués à partir du pré-traitement de sperme d'huitre pendant 15 minutes avec les extraits de boues puis des ovocytes sains sont fécondés. Le développement embryonnaire est suivi pendant une heure après fécondation. L'analyse des anomalies larvaires fait apparaître un effet toxique global qui se manifeste dès 0.05 g/l (figure 34) avec les effets les plus marqués pour les boues de Calais comme le confirment les inhibitions d'AChE *in vitro*.

Ces tests permettent de classer la toxicité des sédiments selon le gradient:

Calais > St Nazaire > Le Havre.

Ce classement correspond aux conclusions des tests d'inhibition d'AChE *in vitro*.

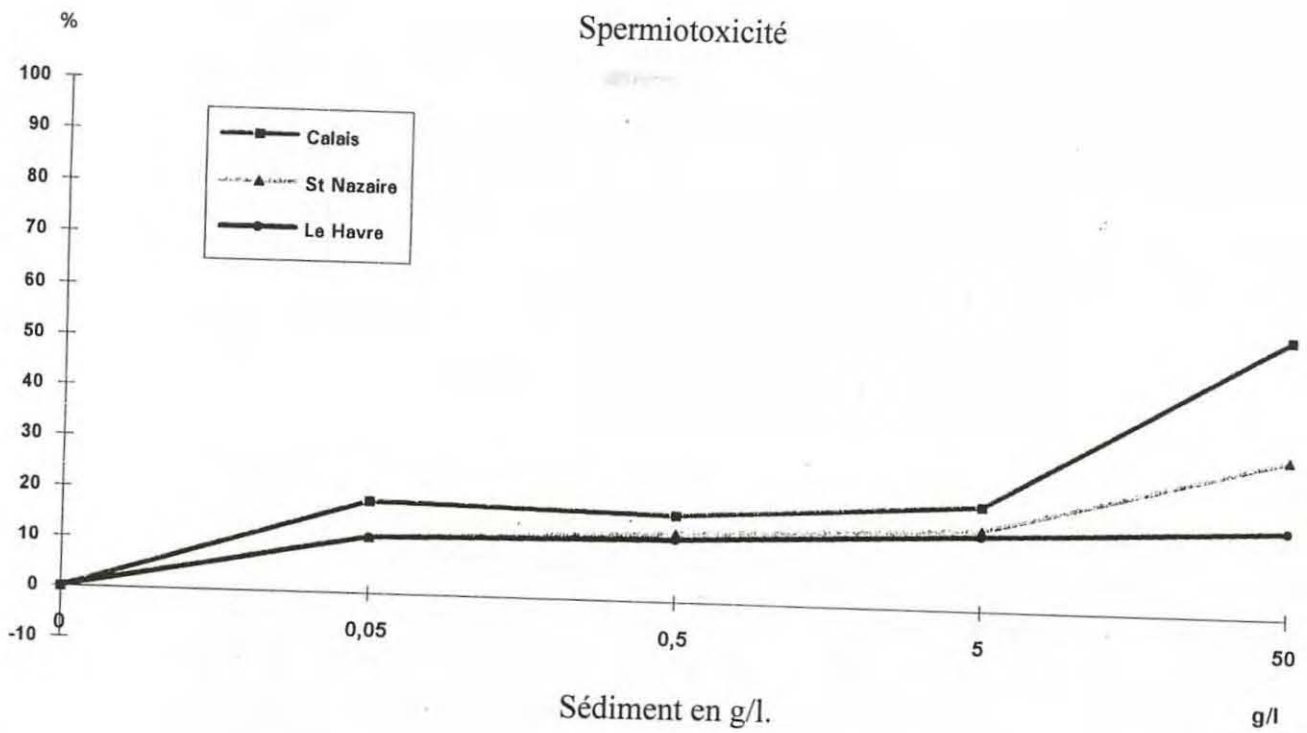


Figure 34 : Tests de spermiotoxicité.

Les résultats sont donnés en pourcentage net d'anomalies embryonnaires (PNA) après fécondation d'ovocytes d'huitre avec le sperme exposé.

3-5. Mesure des activités AChE chez plusieurs espèces méditerranéennes

Lors d'une campagne océanographique en Méditerranée, plusieurs biomarqueurs ont été appliqués à la détection d'effets des contaminants liés notamment aux rejets des grandes métropoles de la partie nord-occidentale de cette mer. La Méditerranée est une mer presque fermée dont le renouvellement est extrêmement lent et où la pollution est particulièrement forte. L'évaluation de l'état sanitaire de la Méditerranée, à travers de grands programmes tels que MEDPOL, a permis de développer et d'appliquer des outils de contrôle des effets des polluants dont l'inhibition des cholinestérases en relation avec des effets neurotoxiques.

Les stations de prélèvement ont été sélectionnées à partir des zones de rejets domestiques et/ou industriels des grandes métropoles méditerranéennes dans un large triangle situé entre la côte d'azur, la côte espagnole et la Sicile.

La route suivie à partir de l'émissaire des égouts de Cortiou descend le long de la côte espagnole puis vers les îles Baléares pour rejoindre la Sicile et enfin remonter le long de la côte italienne. Les sites de prélèvements ont été décidés en fonction de la nature des courants majoritaires dans cette partie de la Méditerranée et des apports sédimentaires qu'ils drainent.

3-5-1. Matériels et méthodes

Ecotoxicité des sédiments sur l'AChE de poisson.

Sur chaque site étudié, quelques centaines de grammes de sédiment sont prélevés sur lesquels des tests d'inhibition de cholinestérase *in vitro* sont entrepris. L'extrait aqueux est obtenu à partir de 3 grammes de sédiment suspendus dans 30 grammes de 0.1 M Tris pH 7. Le mélange est homogénéisé pendant une heure sur un agitateur automatique puis laissé à décanter. Dans une première série de tests on s'intéresse aux effets du temps de sédimentation sur les capacités inhibitrices de l'extrait surnageant en laissant plus ou moins décanter la matière en suspension. L'intérêt de ces tests est de distinguer les effets de polluants passés en solution de ceux dus à l'adsorption sur la matière en suspension. Des prélèvements de 3 ml à 5 mn, 20 mn et une heure sont testés sur un extrait dilué de cholinestérases de muscle dorsal de rouget. Après incubation de l'extrait pendant 3 heures à 4°C avec la source enzymatique, l'activité AChE est mesurée pendant une ou deux heures après addition du DTNB (concentration finale 66 µM) et du substrat (220 µM final). Notons que l'agitation des plaques à microtitration dans lesquelles se fait l'incubation est continue pendant 3 heures.

Activités AChE chez trois espèces méditerranéennes

Sur chacune des stations, des chalutages successifs ont permis de récolter plusieurs espèces en fonction de la nature des fonds.

Les muscles de 8 individus par espèce sont prélevés et préservés immédiatement dans l'azote liquide. Selon les disponibilités locales quatre espèces sont ainsi échantillonnées : le mullet (*Mullus barbatus*) sur 14 stations, le surmulet (*Mullus surmuletus*) sur 5 stations, le serran chèvre (*Serranus cabrilla*) sur 8 stations et le serran hepatus (*Serranus hepatus*) sur 5 stations. Les activités spécifiques AChE sont mesurées selon la méthode d'Ellman décrite précédemment (voir 1-3-1-2).

Les muscles sont traités individuellement et les valeurs sont données en valeur moyenne \pm S.E.M calculée sur huit individus par station.

3-5-2. Résultats et discussion

Ecotoxicité des sédiments

Influence du temps de sédimentation sur la toxicité de l'extrait.

Différentes durées de décantation ont été testées et comparées à l'activité d'un extrait de rouget à partir du sédiment. Les activités sont données en Δ D.O./ 120 minutes pour 10 μ l d'extrait de muscle de rouget.

Les résultats apparaissent sur les figures 35 et 36 et font apparaître que l'intensité des effets inhibiteurs est inversement proportionnel à la durée de sédimentation. A Fos-sur-mer ou à Gènes, les effets inhibiteurs du sédiment sont importants tandis qu'à Capraïa ou Palma la toxicité du sédiment est plutôt faible.

Ces mesures suggèrent que les effets inhibiteurs sont portés par les particules en suspension dans l'extrait aqueux et qu'au fur et à mesure de leur sédimentation les effets toxiques des extraits régressent.

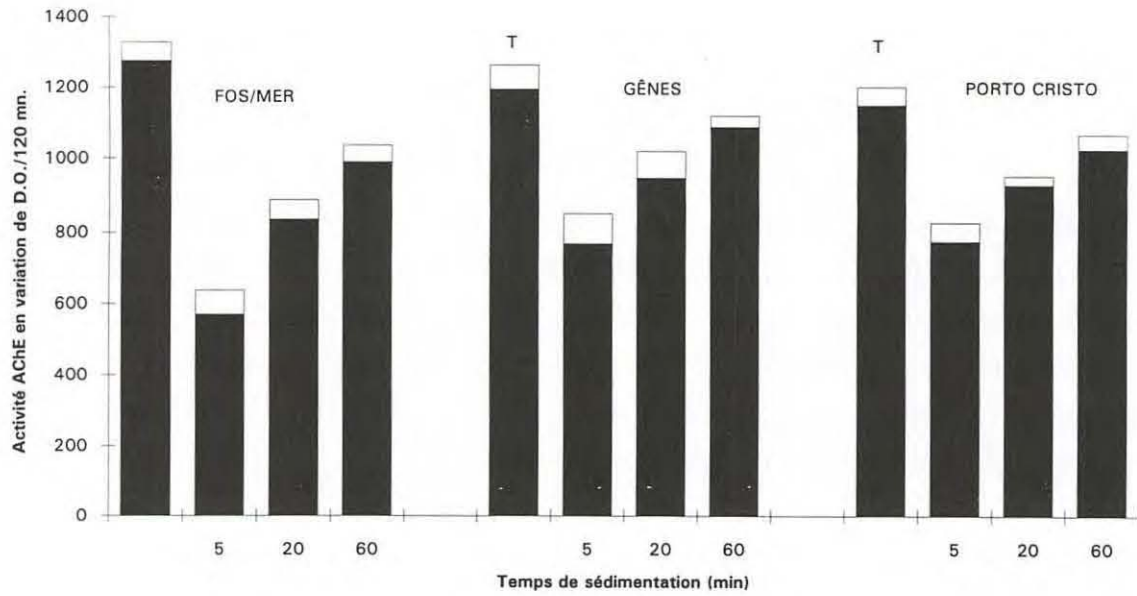


Figure 35 : Effets de la durée de sédimentation sur les effets inhibiteurs in vitro d'extraits aqueux de sédiments de différents sites contaminés de Méditerranée Nord-Occidentale.

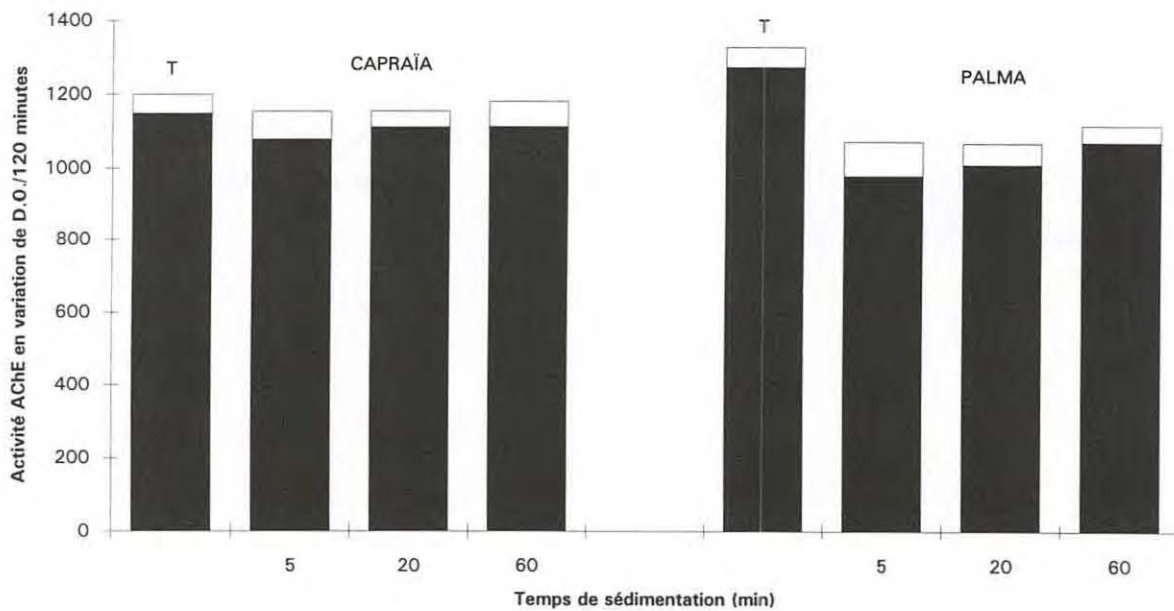


Figure 36 : Effets de la durée de sédimentation sur les effets inhibiteurs in vitro d'extraits aqueux de sédiments de différents sites de référence de Méditerranée Nord-Occidentale.

Les sédiments comptent parmi les compartiments marins les plus contaminés. Cette contamination est produite par l'adsorption sur la matière en suspension de tous les contaminants hydrophobes tels que le DDT, les hydrocarbures aromatiques, les polychlorobiphénils et quantité d'autres molécules plus ou moins identifiées. La remise en suspension des ces particules lors de tempêtes par exemple est un facteur de relargage de matières en suspension contaminées dans la colonne d'eau. Ce phénomène a déjà été cité lors des travaux de Danischewski et al. (1994) qui rapporte l'inhibition de 50% des cholinestérases du muscle adducteur de la moule (*Mytilus edulis*) dans l'estuaire de l'Elbe et la Weser après deux forts coups de vent qui ont provoqué la remise en suspension du matériel organique sédimentaire. Cette resuspension a été l'occasion d'un relargage de molécules adsorbées qui s'est traduit notamment par une élévation significative de la concentration en contaminants notamment en polychlorobiphénils (PCBs). Le traitement de ces sédiments a été l'opportunité de classer 19 prélèvements de stations méditerranéennes traitées durant cette campagne. Les effets inhibiteurs vis-à-vis de l'AcHE de rouget ont été analysés simultanément sur une même plaque à microtitration. Le classement de ces stations en fonction du pouvoir inhibiteur des sédiments qui y sont prélevés est donné par la figure 37.

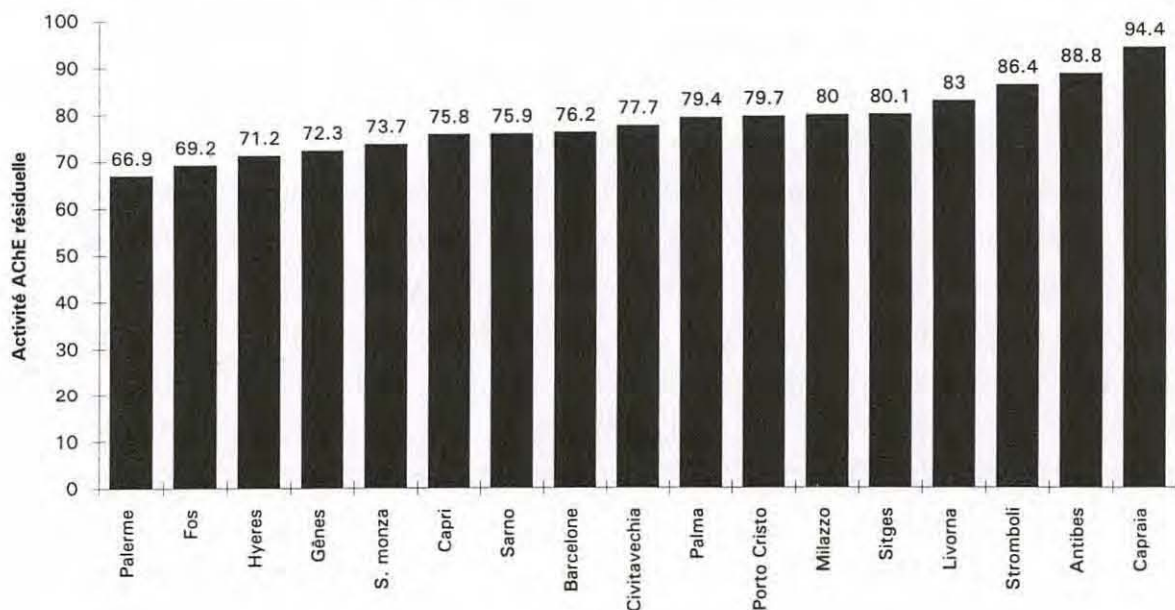


Figure 37 : Classement des sédiments prélevés dans différents sites prospectés lors de la campagne Métromed en fonction de leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis d'un extrait AChE de rouget.

Les activités sont exprimées en % de l'activité témoin

Les sites de Palerme, Fos-sur-mer et Gènes montrent, de manière prévisible, les effets toxiques les plus forts tandis que les sédiments de l'Îlot de Capraïa ou du Stromboli sont presque sans effets. Il faut noter que la granulométrie du sédiment n'est pas prise en compte dans ce type d'étude alors que la part la plus contaminée du sédiment se situe dans la fraction inférieure à 60 μm . Le sédiment constitué de sable grossier est dans ce cas et a priori potentiellement moins toxique. En réalité la majorité des grandes métropoles méditerranéennes est située dans des zones de faibles brassages propices à la déposition sédimentaire telles que baies, anses ou rades abritées. Cette situation topographique associée aux activités anthropiques justifie les fortes contaminations de ces dépôts. A l'opposé on trouve Capraïa, îlot isolé et battu où le sédiment n'est constitué que de sable grossier et de gravier.

Activités AChE chez trois espèces méditerranéennes

Les mesures d'activités AChE de muscle de poisson sont données, par espèce, par les figures 38, 39, 40 et 41. L'étude de l'activité AChE en fonction de la taille du poisson montre chez *Mullus barbatus* une activité inversement proportionnelle à la taille, ainsi les animaux de taille 16-18 cm qui n'ont été capturés que sur les trois stations Milazzo (Sicile), Civitavecchia (côte Ouest de l'Italie) et Santa Manza (Sud Corse) présentent des activités AChE très voisines de l'ordre de 112.5 nmoles/mn/mg P (respectivement 111.5 ± 7 , 112.1 ± 5.8 et 108.8 ± 5 nmoles/mn/mg P). Les individus plus jeunes, de classe de taille 12-14 cm montrent des activités AChE plus élevées. Ces informations sont en accord avec les observations faites sur d'autres espèces telles que le callionyme (*Callionymus lyra*) et le serran chèvre (*Serranus cabrilla*). La comparaison des activités AChE mesurées chez des individus de 12-14 cm, montre que les valeurs les plus élevées sont rencontrées à Antibes (France), Santa Manza (Sud Corse), Tarragone (Espagne) et Civitavecchia (Italie) avec respectivement 258.4 ± 16.0 , 168.8 ± 18.1 , 151.0 ± 20.0 et 145.1 ± 6.57 nmoles/mn/mg P. Les activités les plus faibles sont relevées à Cortiou (France), Rio Ter (Espagne), Gènes (Italie), Cap Finale (Sicile), Sitges (Espagne) et Barcelone (Espagne) avec 91.9 ± 6.5 , 92.1 ± 3.4 , 101.8 ± 6.2 , 107.0 ± 14.6 , 115.4 ± 12.7 et 117.3 ± 10.1 nmoles/mn/mg P. Les mêmes mesures pratiquées sur l'espèce *Serranus cabrilla* donnent les valeurs d'activité AChE les plus faibles à Cortiou (182.4 ± 13.6) tandis que les plus fortes sont relevées à Santa Manza (4341.6 ± 16.8) et à l'Île de Capraïa (362.2 ± 34.8), îlot isolé situé au Nord-Ouest de la Corse. Les activités AChE mesurées sur l'espèce *Serranus hepatus* donnent les valeurs les plus basses à Naples (166.3 ± 10.4) et les plus élevées à Civitavecchia (298.6 ± 20.7). Ces chiffres qui donnent les mêmes informations et montrent une différence d'activité qui peut

atteindre 50% entre les valeurs extrêmes suggère la présence de substances inhibitrices dans le biotope des poissons prélevés sur les stations présentant les activités les plus faibles.

Les insecticides organophosphorés et carbamates sont connus à ce jour comme étant les plus puissants inhibiteurs de cholinestérases et l'inhibition de l'AChE est le mode d'action de ces insecticides. La plupart de ces molécules induit des inhibitions significatives à des concentrations dans l'eau comprises entre 0.1 et 1 ng/l. La présence de ces molécules dans les sédiments de Cortiou peut s'expliquer par la présence proche de cette ville de l'émissaire de rejets des eaux d'épuration de l'agglomération Marseillaise (3.5 millions d'habitants) mais en l'absence de données chimiques précises sur la présence de ces produits, il est difficile de conclure.

De manière générale les valeurs les plus fortes sont mesurées dans des zones exemptes de contamination industrielle ou agricole notoires (Sud Corse, Ile Capraïa), en revanche les valeurs les plus faibles sont observées sur des sites fortement contaminés (Golfe de Gênes, Cortiou, Naples, Barcelone). Les données sur les niveaux de présence des composés organophosphorés et carbamates dans les différents compartiments marins sont rares, toutefois des teneurs en OP atteignant 300 ng/g de chair ont été mesurées chez *Mullus barbatus* et *Gambusia affinis* prélevés dans le delta de l'Ebre (Barcelo et al., 1991. UNEP/WHO, 1991). Des traces d'éthylparathion et de malathion ont été détectées dans les eaux de drainage de Camargue (France). Les difficultés analytiques nous privent d'informations fiables sur la présence de ces molécules dans le milieu marin car il faut savoir que la détection de ces produits se fait molécule par molécule or une quarantaine de molécules différentes d'organophosphorés et une vingtaine de molécules distinctes de carbamates sont utilisés en France (1993). L'évaluation des teneurs en OP et C totaux est donc extrêmement difficile et le risque de sous estimation est grand. D'autre part une étude récente (Bocquené et al, 1995) a confirmé la très grande synergie d'effets des organophosphorés et des carbamates quand ils sont associés. L'ensemble de ces informations, sensibilité, spécificité de la cible cholinestérasique et synergie des effets inhibiteurs rend probable, en l'absence de données chimiques confirmantes, l'existence d'effets inhibiteurs liés à la présence de contaminants neurotoxiques dans le sédiment marin littoral.

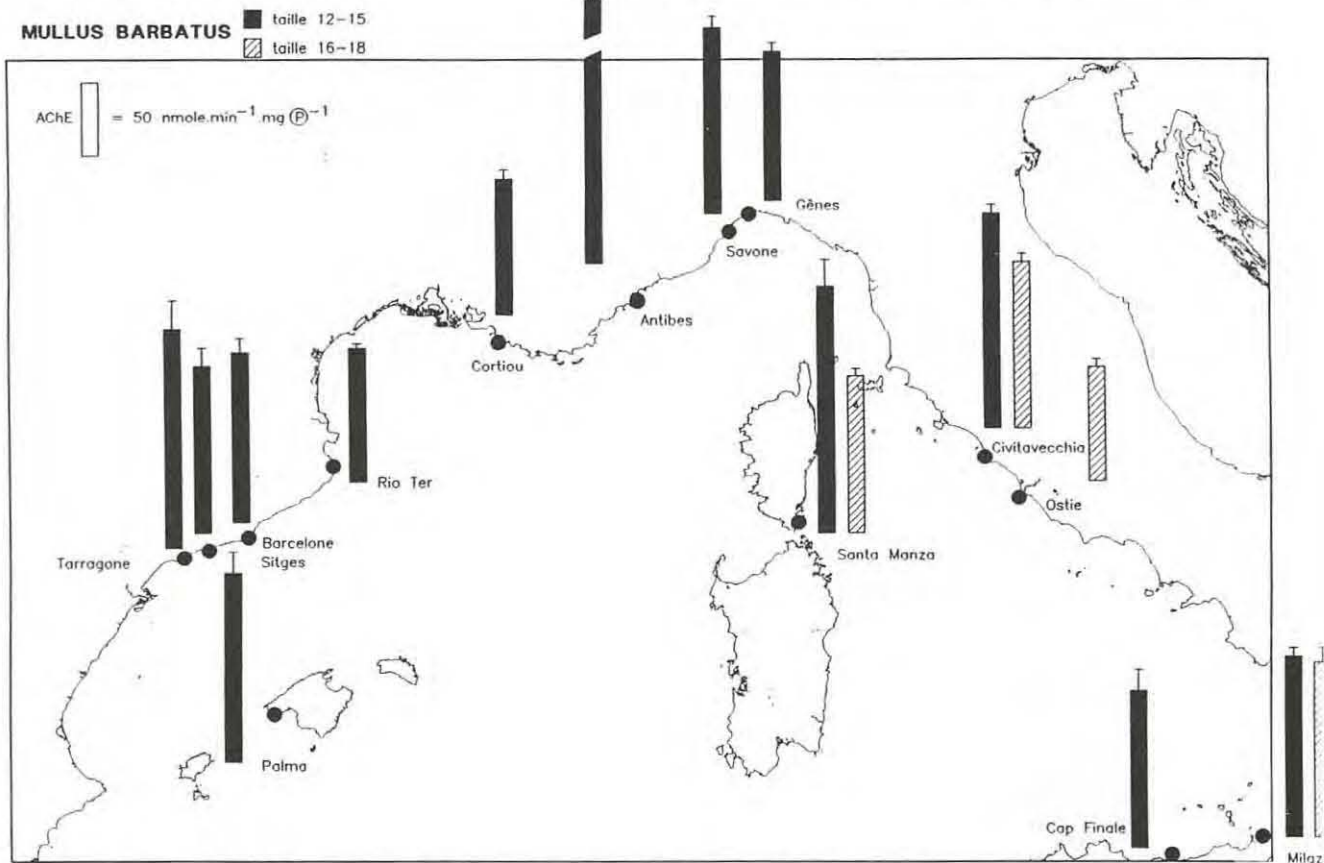


Figure 38 : Niveaux d'activité AChE chez *M.barbatus* capturé en Méditerranée

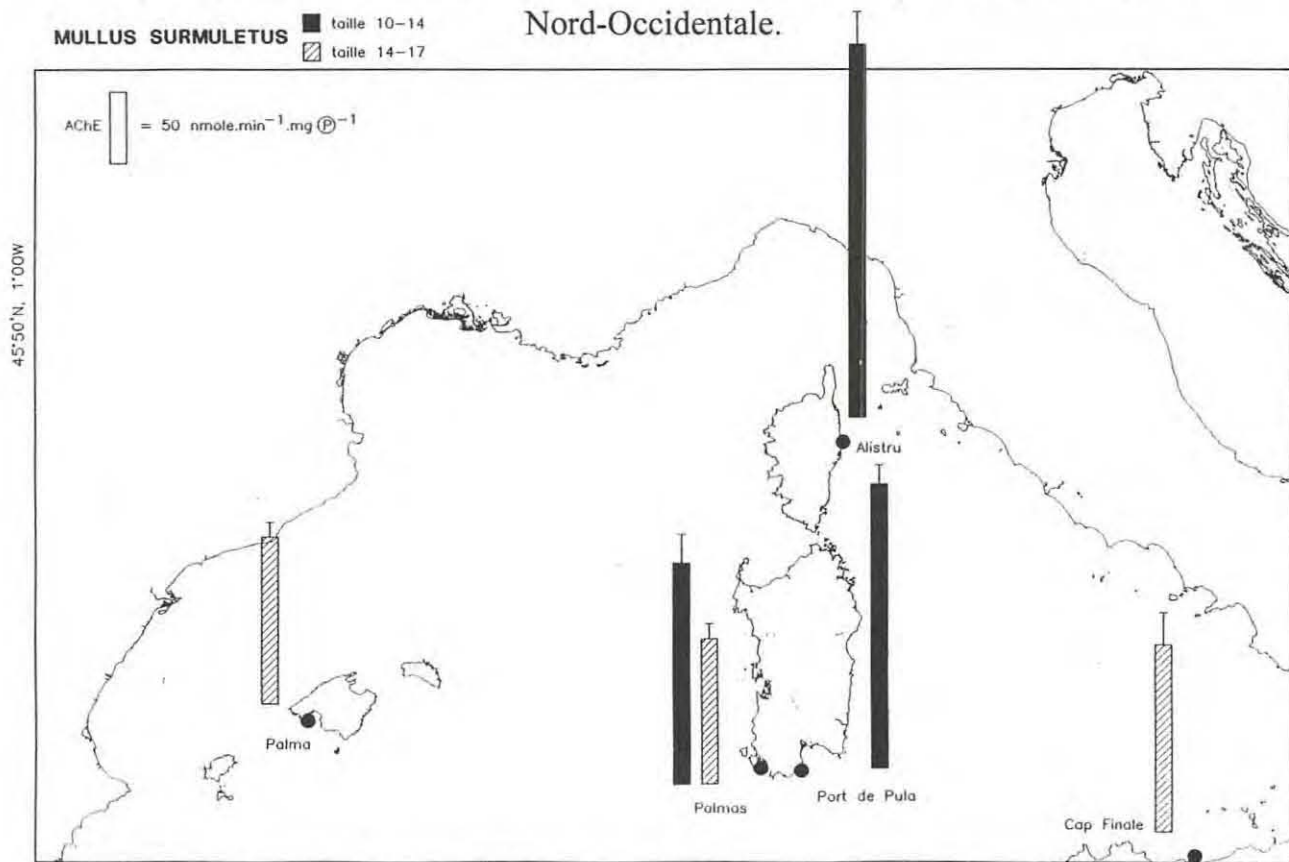


Figure 39 : Niveaux d'activité AChE chez *M.surmuletus* capturé en Méditerranée Nord-Occidentale.

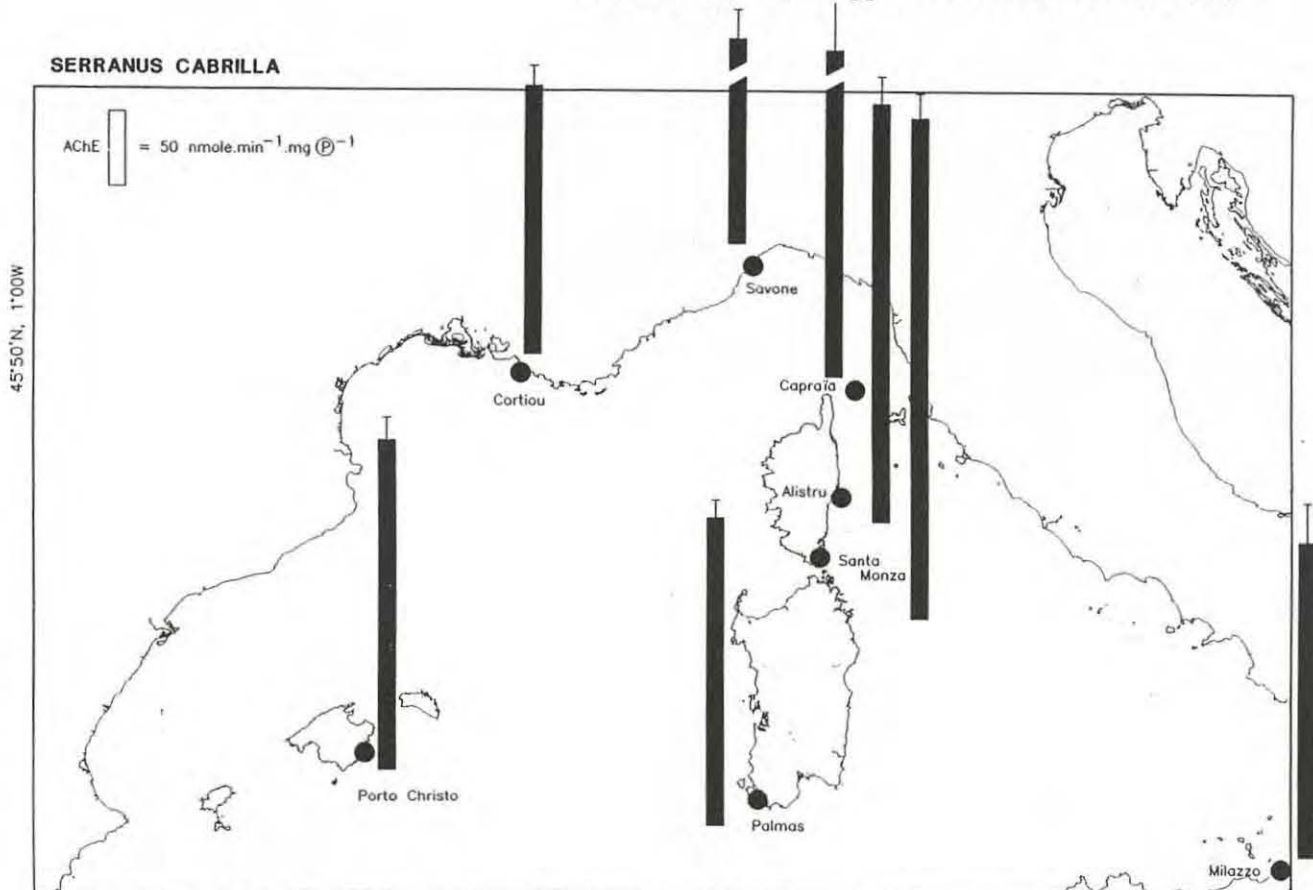


Figure 40 : Niveaux d'activité AChE chez *S.cabrilla* capturé en Méditerranée

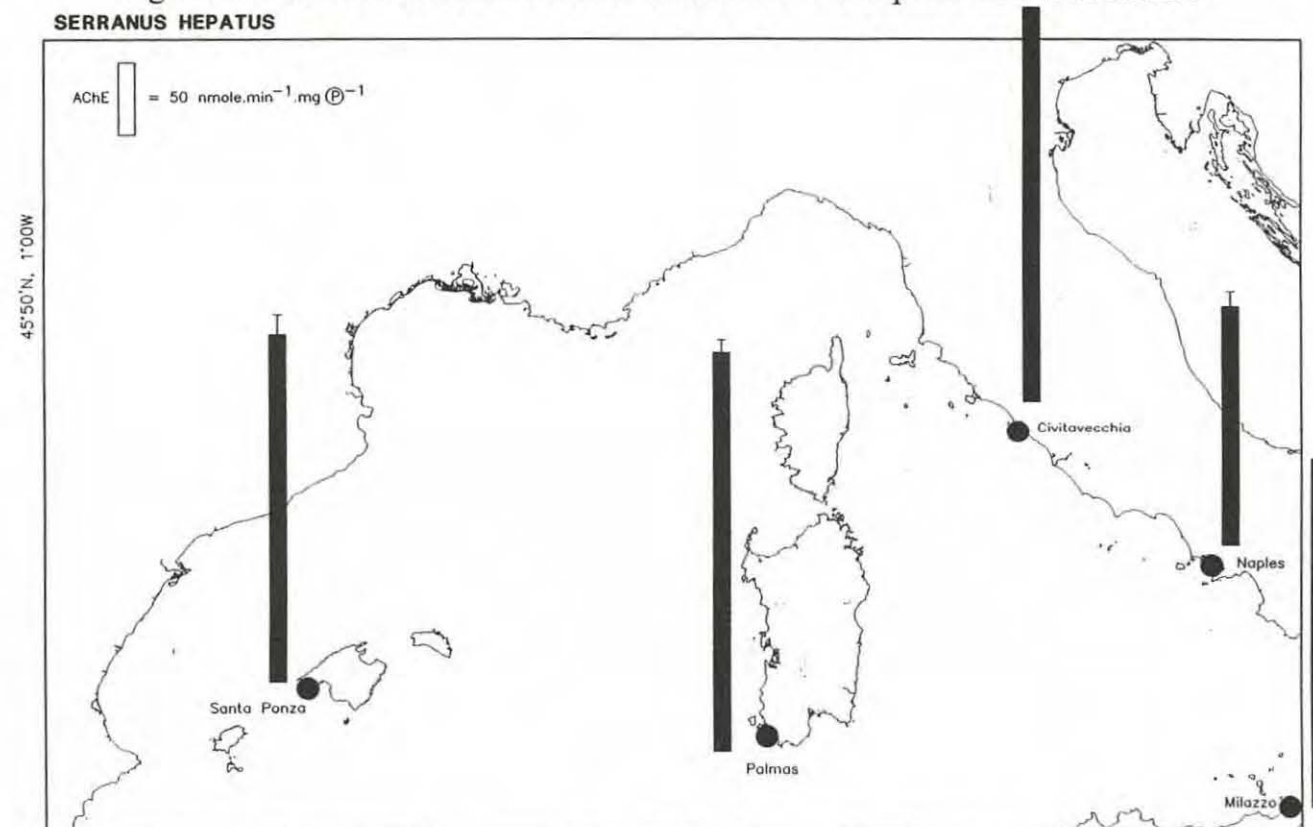


Figure 41 : Niveaux d'activité AChE chez *S.hepatus* capturé en Méditerranée Nord-Occidentale.

PUBLICATION 4 :

**Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern part of the
Mediterranean Sea**

Sous presse pour Marine Ecology Progress Series

Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea

T. Burgeot^{1,*}, G. Bocquéné¹, C. Porte³, J. Dimeet², R. M. Santella⁴,
L. M. Garcia dela Parra³, A. Phfol-Leskowicz⁵, C. Raoux³, F. Galgani¹

¹IFREMER, Laboratoire d'écotoxicologie, BP 1049, F-44037 Nantes, France

²IFREMER, Laboratoire environnement littoral de ■ la Seyne/mer, BP 330, F-83507, France

³CSIC, Dept. de química ambiental, Jordi Girona 18-26, E-08034 Barcelona, Spain

⁴Columbia University, 701 West 168th Street, New York, New York 10032, USA

⁵ENSAT, 145 Avenue Muret, F-30176 Toulouse, France

ABSTRACT: Several bioindicators were used to evaluate the biological and genotoxic effects of marine pollutants near large coastal cities in the northwestern part of the Mediterranean Sea. Three target species of teleosts were selected: red mullet *Mullus barbatus* and 2 types of comber (*Serranus hepatus* and *S. cabrilla*). Induction of ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity specific for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and polychlorinated biphenyls (PCB) was measured in the livers of the fish, and inhibition of acetylcholinesterase (AChE) by organophosphorus insecticides and carbamates was measured in their muscle tissues. Maximal EROD activities (16.8 ± 2.7 to 19.4 ± 4.2 pmol min⁻¹ mg protein⁻¹) recorded in red mullet near Barcelona (Spain), Milazzo (Sicily) and Ostia (Italy) indicated exposure to high pollutant concentrations. Inhibitions of AChE activity were low in areas remote from agricultural and industrial activity. The highest inhibitions were measured at sites of heavy industrial and domestic waste, such as Genoa and Naples (Italy), Rio Ter (Spain), Barcelona, and Cortiou (France). Inhibition of AChE activity was higher at a given station for younger individuals 120 to 140 mm in length than for those 160 to 180 mm long. Antioxidant enzyme activities (catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and DT-diaphorase) were measured in red mullet livers at 5 stations along the French and Spanish coasts. Catalase activity was highest at Cortiou, consistent with higher levels of pollution, and lower at Mallorca (Balearic Islands). Varying responses were obtained for the other antioxidant enzymes. Glutathione S-transferase (GST), a detoxification enzyme, was also measured in the livers of red mullet fish and found to be significantly higher at Cortiou than at the other locations studied. Chemical measurement of PAH in surface sediment indicated the pyrolytic origin of this contaminant for all stations except Milazzo (petroleum origin). Detection of DNA adducts as a bioindicator of exposure to carcinogenic substances was tested according to 2 complementary assay techniques: enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and ³²P-postlabeling. ELISA revealed maximal quantities of PAH-DNA at Barcelona (15 adducts per 10⁸ nucleotides), Cap Finale (Corsica) (20.8) and Milazzo (15.5). The richest adduct profiles were detected by the ³²P method at Antibes (France), Santa Ponza (Balearic Islands), Milazzo and Cap Finale, with a maximum of 6.2 adducts per 10⁸ nucleotides at Milazzo. This multimarker approach showed that pollutant exposure levels varied according to site. With a sedimentary PAH profile apparently resulting from petroleum pollution, the Milazzo station had the greatest quantity of DNA adducts and the highest inductions of EROD activity and AChE inhibitions in *M. barbatus* and *S. hepatus*.

KEY WORDS: EROD · GST · AChE · Antioxidant enzymes · Biomonitoring · DNA adducts · PAH · *Mullus barbatus*

INTRODUCTION

Evaluation of the impact of contaminants in coastal areas of the Mediterranean Sea has become a priority for the countries directly concerned. With the support

of international organizations (e.g. FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations; UNEP: United Nations Environment Programme; IOC: Intergovernmental Oceanographic Commission) for the coordination of environmental protection, a pilot program for biomonitoring in the northwest Mediterranean (MED-POL) was set up to develop sensitive and

*E-mail: ■

© Inter-Research 1996

Resale of full article not permitted

reliable methods for estimating the state of exposure of organisms to pollutants. Studies of the activity of bio-protection systems in representative marine organisms of coastal benthic ecosystems were performed (GICBEM 1992) along French coasts, and monitoring of biological effects at the Marseille/Fos-sur-Mer pilot site was set up in 1992 in the context of the National Observation Network (NON) (Burgeot et al. 1994a). A biomonitoring program was initiated in the Provence/Alpes/Côte d'Azur region in the northwestern part of the Mediterranean to develop and validate 4 biomonitoring techniques selected in the context of MED-POL, the Mediterranean pollution network (Roméo et al. 1993).

The purpose of the present study was to test the bioindicators recommended by the International Council for the Exploration of the Sea (ICES) and MED-POL for monitoring the marine environment at sites particularly exposed to domestic and industrial waste. Biochemical indicators were measured, along with chemical and genotoxic parameters, in 3 target species of teleosts, red mullet (*Mullus barbatus*) and 2 combers (*Serranus hepatus* and *S. cabrilla*), in coastal areas of the northwest Mediterranean adjacent to large cities. Measurements of hepatic monooxygenase activities and neurospecific activity are now recognized and used as bioindicators of exposure to chemical contaminants (ICES 1994). Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), specific for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and planar polychlorinated biphenyls (PCB), and glutathione S-transferase (GST, EC 2.5.1.18), a detoxification enzyme (Phase II), were measured in the fish livers. Acetylcholinesterase (AChE), specifically inhibited by organophosphorus insecticides and carbamates, was measured in muscle tissues of the 3 target species. The activity of antioxidant hepatic enzymes such as catalase, superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), glutathione peroxidase selenium (GPX, EC 1.11.1.9) and DT-diaphorase (NAD)(P)H-quinone oxidoreductases (NADPH, EC 1.6.99.2) were measured as potential biomarkers of oxidative stress (Di Giulio et al. 1989). Increase in activities of antioxidant enzymes following field (Livingstone et al. 1992) and experimental exposure to xenobiotics (Mather-Mihaich & Di Giulio 1986, 1991a, Markovics et al. 1987) have been detected in a number of fish species, but the responses have not been quantitatively reproducible. The use of these enzymes as biomarkers for environmental oxidative stress is therefore unproven, but merits further research.

The use of xenobiotic DNA adducts as indicators of exposure to genotoxic compounds is a more recent procedure recommended for environmental studies (McCarthy et al. 1989, Varanasi et al. 1989, Stein et al. 1992). In some fish species, the amount of an adduct

formed in a target tissue is modulated by Phase II enzymatic reactions, while in other species, the extent of activation of the carcinogen by Phase I enzymes is the major determinant in adduct formation. As a measure of exposure, DNA adducts integrate the factors of uptake, metabolism, and repair and provide an assessment of the dose of carcinogen reaching a target tissue such as liver (Maccubin 1994). In 1964, Dawe et al. suggested the use of bottom-feeding fish to detect environmental carcinogens. We chose to measure DNA adducts in the liver of *Mullus barbatus* because this fish is uniformly distributed along the coasts of the northwestern Mediterranean Sea and because it lives in contact with the sediment. The most widely used method for DNA adducts assessment is the use of radiolabeled chemicals (^{32}P -postlabeling) (Baird 1979). This technique has proven valuable for the chemicals that can be synthesized in radioactive forms with high specific activities (Maccubin 1994). Therefore, an alternative method, such as an immunochemical one, that does not require administration of radiolabeled compounds, is needed. We chose ^{32}P -postlabeling and immunochemical (ELISA) methods based on studies of biomonitoring application in the marine environment (Ericson et al. ■ 1993, Stein et al. 1993) and in humans (Schoket et al. 1993). All of these sensitive methods have advantages and disadvantages. The method chosen for adduct analysis depends on the types of adducts to be detected, the availability of antibodies and the instrumentation that might be especially required for monitoring applications. ^{32}P -postlabeling is a very sensitive but very complex method. Immunochemical detection of BaP DNA adducts is simpler for a routine application; the major adduct formed *in vivo* is the BaP DNA adduct (BPDE) (Sikka et al. 1991).

As the sediment is a possible source of genotoxic chemicals, analyses of PAH in sediment and measurements of DNA adducts (ELISA and ^{32}P -postlabeling) in red mullet livers were performed in the present study to identify the origin of pollution and demonstrate genotoxic alterations of DNA. This study presents the first results obtained on a large geographical scale for the northwestern Mediterranean Sea, enabling biomonitoring of contaminant effects in sensitive areas.

MATERIALS AND METHODS

Fish and sediment

Our cruise followed a route in the form of a loop, from 30 March to 28 April. We first sailed from France toward Spain along the coast, following the dominant northeast current which conveys pollutants toward the southwest. We then passed through the Balearic

Islands of Spain, reached the Sicilian coast, and sailed northward in the Tyrrhenian Sea of Italy, following the Liguro-Provençal current which skirts the continental slope from the Gulf of Genoa to the Catalan Sea (see Fig. 1).

Mullus barbatus, *Serranus cabrilla* and *S. hepatus* were trawl-fished on the continental shelf to obtain 8 individuals of each species per station. The trawling runs were conducted for 20 min periods. When trawling was impossible, combers were fished with a rod and line. As the cruise covered a considerable geographical area, we were obliged to concentrate our fishing efforts on trawling operations; this explains why sampling was better for the red mullet, which is easier to obtain by this technique. The combers were thus considered as complementary target species.

Individuals of the same size class, without sexual differentiation, were selected to ensure uniform sampling. Mean sizes (in mm) were 129 ± 14.1 to 160 ± 7 for *Mullus barbatus*, 90 ± 12 to 99 ± 14 for *Serranus hepatus* and 131 ± 28 to 186 ± 28 for *S. cabrilla*. Liver and muscle tissues were collected, washed in buffer (KCl 150 mM, Tris 50 mM, pH 7.4) and stored in liquid nitrogen for biochemical analysis. Nineteen stations were sampled in coastal areas near large northwest Mediterranean cities.

Surface sediment collected with a scoop (shippeck) before each trawling run was stored at -20°C for chemical analysis.

Biochemical analyses

EROD measurement. EROD activity was assayed in fish livers using a fluorometric microplate reader, according to the method of Galgani & Payne (1991).

For extract preparation, liver tissue was washed in buffer (Tris 50 mM, KCl 150 mM, pH 7.4) at 4°C and then ground for 10 s in an Elvehjem potter before centrifugation ($9000 \times g$ for 15 min at 4°C). The supernatant was used as an enzymatic solution.

Proteins were measured in supernatant according to the method of Bradford (1976), using BSA as the standard protein. Measurements were performed by microplate spectrophotometer readings at 595 nm, and concentrations were expressed in mg ml^{-1} .

Analysis of EROD activity was performed at 4°C using 10 μl of extract in 200 μl of buffer (Tris 0.1 M, NaCl 0.1 M, pH 8.0) containing 2 μM of 7-ethoxyresorufin (10 μl) and 0.25 mM of NADPH (10 μl). Activity was determined by kinetic measurement at room temperature in supernatant. The quantity of resorufin formed by catalysis was measured by fluorometry (Galgani & Bocquéné 1989) according to the modified method of Burke & Mayer (1974), with excitation at

544 nm and emission at 584 nm. Kinetics were determined in supernatant at the final 1% dilution. Microplate measurements were performed using a Fluoroscan II fluorometric reader (Grzebyk & Galgani 1991), each plate being read in 1 min. Kinetics were linear for 10 min. An external resorufin standard was used to convert fluorescence units into pmol. Results are expressed in $\text{pmol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$.

GST measurement. Glutathione S-transferase (GST) activity was measured in the cytosolic fraction using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as a substrate, as described by Habig et al. (1974), the final reaction mixture containing 1 mM CDNB and 1 mM reduced glutathione.

AChE measurement. AChE was measured according to the colorimetric method of Ellman et al. (1961) as adapted to a microplate reader. The staining produced by interaction of the DTNB (dithio-bis-nitrobenzoic acid) ion with free thiol groups was measured at 412 nm during acetylthiocholine hydrolysis by AChE.

Muscle tissue from 8 individuals per species obtained at each sampling site was removed and immediately stored in liquid nitrogen. Depending on conditions of local availability, samples of the 3 species were collected as follows: *Mullus barbatus*, 14 stations; *Serranus cabrilla*, 8 stations; and *S. hepatus*, 5 stations.

Specific antioxidant enzymes. Supernatant after $10000 \times g$ centrifugation and cytosolic fraction ($100000 \times g$ supernatant) were prepared essentially as described in Förlin & Andersson (1985). The tissue was homogenized in a 1:4 tissue weight:buffer volume ratio in 100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 7.4, containing 0.15 M KCl.

Biochemical measurements were carried out on a UVIKON 941 plus dual-beam spectrophotometer. Antioxidant enzymes were measured essentially as described in Livingstone et al. (1990). Catalase activity was measured in the cytosolic fraction ($100000 \times g$ supernatant) using 50 mM H_2O_2 as a substrate. SOD activity was determined by the degree of inhibition of the cytochrome c reduction by superoxide anion radical as described in McCord & Fridovich (1969). The activity of this enzyme is given in SOD units (1 unit = 50% of the inhibition of the cytochrome c reduction). GPX activity was measured by the NADPH consumption during the formation of reduced glutathione by commercial glutathione reductase using 0.8 mM H_2O_2 as a substrate (Greenwald 1985). DT-diaphorase activity was measured in $10000 \times g$ supernatant as the dicumarol inhibitable part of NAD(P)H-dichlorophenol (DCPIP) reductase activity. The reduction of DCPIP was measured in the absence and presence of 100 μM dicumarol as described by Benson et al. (1980). Cytosolic and $10000 \times g$ supernatant proteins were measured according to the method of Lowry et al. (1951).

Chemical analyses

Chemical measurement of PAHs in sediment.

Extraction and isolation of PAHs: Lyophilization was performed directly for 48 h (Telstar apparatus) in the containers used for total surface sediments and without preliminary freezing. From 8 to 15 g of bulk sediment was extracted by sonification with a dichloromethane (DCM) methanol mixture (2:1 v/v). The samples were first Vortex agitated into 75 ml glass centrifuge tubes, with 50 ml of solvent, then sonicated for 10 min and finally centrifuged at 5000 rpm for 15 min (Beckman Model TJ-6 centrifuge); this was all performed 3 times.

Total organic extracts (TOE) were rotary evaporated under reduced pressure nearly to dryness then dried under a gentle stream of nitrogen. TOE purification was performed using 6 ml microcolumn packed with 1 g of florisil (waters Sep-pack) previously conditioned with 40 ml MeOH, then 20 ml hexane. The PAH containing fraction was eluted by 20 ml of hexane-DCM (1:1 v/v) that was concentrated to about 1 ml as described above. After transferring the mixture into a 1.5 ml pelleter and drying it under a nitrogen stream, the PAH fraction was finally rediluted with a solution in iso-octane of Pyrene d10 (CIL, Woburn, Massachusetts, USA) used as an internal standard. All solvents (Merck, Darmstadt, Germany) were for organic trace analysis.

GC-MS analysis of PAHs: The PAH fractions were analysed in a GC 8000 series gas chromatograph coupled with an MD 800 series quadrupole mass spectrometer (Fison Instruments, Milan, Italy). Ion source and interface temperatures were held at 200 and 280°C respectively, and helium was used as carrier gas at 30 cm s⁻¹. Injection was performed in the splitless mode, and a 25 m long fused silica column (0.2 mm i.d.) coated with a 0.25 µm thick film of 5% diphenyl methylpolysiloxane (DB5) was used with the following temperature programme: 1 min at 90°C, from 90 to 150°C at 15°C min⁻¹ then from 150 to 310°C at 6°C min⁻¹. The electron energy was 70 eV and single ion monitoring (SIM) was set as the detection mode with the following molecular ions as diagnostic: m/z = 178, 184, 192, 198, 202, 206, 212, 228, 252, 276, 278 (dwell time 70 ms). Peak integration was performed using the VG-Lab-Base software (Fison Instruments). The list of PAHs that were systematically analysed is indicated in Table 2. A standard mixture containing the 16 EPA (US Environmental Protection Agency) priority pollutant PAHs was used for identification and quantification of PAHs.

Determination of PAH-DNA adducts

Immunochemical method. Isolation of DNA: For DNA isolation, a 10% homogenate was prepared in

Tris 10 mM, pH 7.9, EDTA 1 mM and NaCl 0.4 M, with sodium dodecyl sulfate added to give a final concentration of 0.2%. Samples were treated with proteinase K (final concentration 200 µg ml⁻¹) at 37°C for 1 to 2 h, then extracted with phenol. The nucleic acids were collected by ethanol precipitation and resuspended in buffer. Hog pancreas alpha-amylase was added to a final concentration of 200 µg ml⁻¹ and samples incubated at 37°C for 1 h. After adjustment to 0.4 M NaCl, RNase was added to a final concentration of 50 µg ml⁻¹ and samples were incubated for 45 min. Proteinase K was added to a final concentration of 100 µg ml⁻¹ and incubation continued at 37°C for 45 min. Samples were extracted with chloroform:isoamyl alcohol, DNA precipitated with ethanol and resuspended in PBS (phosphate buffered saline).

Determination of PAH-DNA adducts by ELISA:

PAH diol-epoxide-DNA adducts were analysed by competitive ELISA essentially as previously described (Santella et al. 1992). Briefly, 96-microwell black plates (Microfluor 'B', Dynatech Laboratories, Chantilly, VA, USA) were coated with 0.2 ng BPDE-I-DNA (5 adducts per 10³ nucleotides). A previously characterized rabbit antiserum (Poirier et al. 1980) was used at 1:1 600 000 dilution and a standard curve was constructed by mixing 50 µl diluted antiserum with BPDE-I-DNA (1.5 adducts per 10⁶ nucleotides) in carrier nonmodified calf thymus DNA (such that 50 µl contained 5 to 150 fmol BPDE-I-deoxyguanosine adduct in 50 µg DNA) Test samples were assayed at 50 µg well⁻¹ after sonication and denaturation by boiling for 3 min and cooling on ice. Goat anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA) was used at 1:400 dilution and the substrate was 4-methylumbelliferyl phosphate (100 µl, 50 µg ml⁻¹ 0.1 M diethanolamine pH 9.6). Fluorescence was read on a Microfluor reader (Dynatech Laboratories) connected to an IBM computer for data analysis. Samples were run in triplicate and median values used for determination of % inhibition. For analytical purposes, those samples with <15% inhibition were considered nondetectable and assigned a value of 1/10⁸, an amount midway between the lowest positive value and zero. A positive control of DNA isolated from animals treated with BaP and negative control of human fetal lung DNA was run with every assay.

Results are expressed as BPDE-I-DNA equivalent adducts but correspond to the quantification of multiple PAH diol-epoxide-DNA.

³²P-postlabeling method: DNA was extracted and purified according to the method described by Reddy & Randerath (1986) and modified by Phfol-Leszkiwicz et al. (1991, 1993). Labeled normal nucleotides and residual ATP were eliminated by an initial chromatography on polyethyleneimine-cellulose plate in solvent NaH₂PO₄

2.3 M, pH 5.7 overnight. The area deposit containing marked and purified adducts was cut and transferred onto another migration polyethylenimine-cellulose plate, in the solvent: urea 7.65 M format Li 4.77 M, pH 3.5. Two migrations in solvent NaH_2PO_4 0.6 M and urea 5.95 M, pH 6.4 and NaH_2PO_4 1.7 M, pH 6 were conducted perpendicularly to urea 7.65 M format Li 4.77 M, pH 3.5 to attain a better adduct separation.

Statistics

Means \pm standard deviations (SD) for EROD activities were calculated from 4 replicates each for 8 fish per station. For AChE, muscle tissue was treated individually and the values given in means \pm SD calculated for 8 individuals per station. Measurement of antioxidant enzymes was performed on 6 fish livers and the mean \pm SD calculated.

The smallest significant difference test (Z-test) was performed by comparing the station with the lowest induction (the reference station) with the other stations for EROD and stress proteins. For AChE activity, the lowest inhibition was compared with those of the other stations.

Mean DNA adduct measurements by ELISA were calculated from duplicates of a mixture of fish livers from the same station. The method of detecting adducts by ^{32}P -postlabeling as well as the quantification of sediment PAH were qualitative and thus not suitable for statistical analysis.

RESULTS

Measurement of EROD activity

EROD activity was detected in 8 *Mullus barbatus*, *Serranus cabrilla* and *S. hepatus* livers (Beliaeff & Burgeot ■). The red mullet was considered the main target species because of better sampling (14 stations); the 2 combers were used as complementary species (11 stations). Measurement of EROD activity specifically induced by planar PCB and PAH allowed observation of maximal responses for red mullet at the Barcelona (Spain), Milazzo (Sicily) and Ostia (Italy) sites. For the combers, the 3 highest inductions of EROD activity were measured at Milazzo and Civitavecchia (Italy), Cortiou (France) and Santa Manza (France) (Fig. 1).

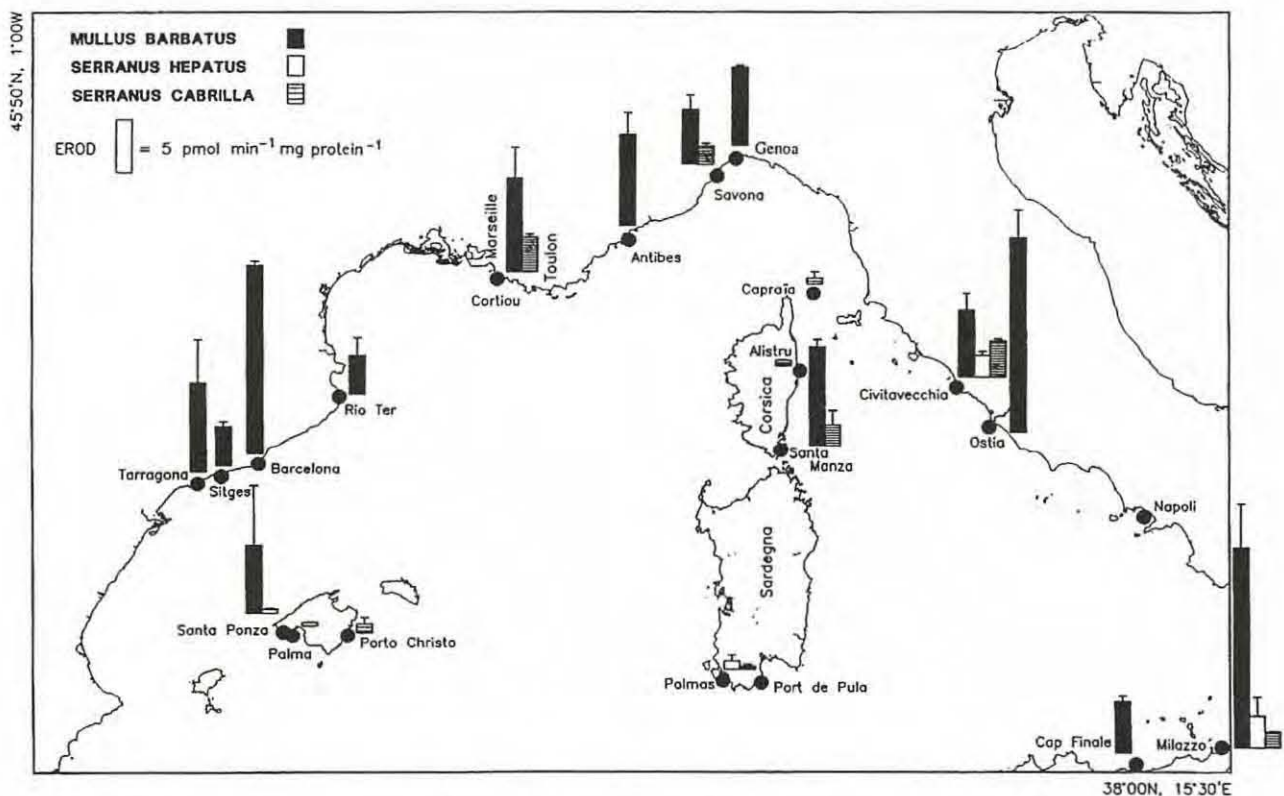


Fig. 1. *Mullus barbatus*, *Serranus hepatus*, *S. cabrilla*. Measurement of EROD activity in the livers of 3 target species of teleosts. Mean and SD, calculated from 4 replicates per individual are shown for each station

Table 1a. *Mullus barbatus*. EROD and AChE activities, DNA adducts (by ELISA and ³²P methods), and PAH in sediment at 11 stations. nd: no data; p: statistical difference (p < 0.05)

Station	<i>Mullus barbatus</i>						Sediment	
	No. of specimens (n)	Body length Mean ± SD (mm)	EROD Mean ± SD (pmol min ⁻¹ mg prot ⁻¹)	AChE Mean ± SD (U mg prot ⁻¹)	Adducts ELISA (PAH equivalent) Adducts/10 ⁸ nucleotides	Adducts ³² P (TOT adducts) Adducts/10 ⁸ nucleotides	PAH/TOT sed (ng g ⁻¹)	Depth (m)
Cortiou	8	129 ± 1.41	9 ± 2.9 (p)	1225 ± 87 (p)	7.3	1.2	37507.5	30
Barcelona	8	160 ± 70	18.2 ± 0.1 (p)	1564 ± 134 (p)	15	1.1	894.39	24
Santa Ponza	8	141 ± 14.1	6.6 ± 5.7	1726 ± 201 (p)	8.5	2.9	47.42	58
Cap Finale	8	155 ± 14.1	4.9 ± 0.5 (p)	1427 ± 195 (p)	20.8	3.5	72.52	20
Milazzo	8	150	19.4 ± 4.2 (p)	1645 ± 80 (p)	15.5	6.2	183.65	28
Ostia	7	151 ± 42	16.8 ± 2.7 (p)	nd	10.8	1.3	nd	nd
Civitavecchia	8	133 ± 7	6.5 ± 1.6 (p)	1934 ± 87 (p)	nd	1.7	nd	nd
Santa Manza	8	140	9.5 ± 0.7 (p)	2250 ± 241 (p)	nd	nd	97.45	76
Genoa	8	143 ± 14.1	7.5 ± 0.19 (p)	1357 ± 83 (p)	nd	nd	19371.8	35
Savona	8	120	5.2 ± 1.4	1698 ± 105 (p)	12.8	0.5	3058.46	27
Antibes	8	120	8.6 ± 2.1 (p)	3445 ± 213 (p)	nd	2	170.89	50

Table 1b. *Serranus cabrilla* and *S. hepatus*. Measurements of EROD and AChE activities at 6 stations. Data represent mean value and SD for EROD and the mean value and standard error of the mean for AChE (number of individuals indicated in parentheses). Data were compared statistically by a Z-test for the smallest significant difference (p < 0.05). nd: no data; p: statistical difference (p < 0.05)

Station	<i>Serranus hepatus</i>				<i>Serranus cabrilla</i>			
	No. of specimens (n)	Body length (mm)	EROD Mean ± SD (pmol min ⁻¹ mg prot ⁻¹)	AChE Mean ± SD (U mg prot ⁻¹)	No. of specimens (n)	Body length (mm)	EROD Mean ± SD (pmol min ⁻¹ mg prot ⁻¹)	AChE Mean ± SD (U mg prot ⁻¹)
Cortiou		nd	nd	nd	8	17.9 ± 14.1	3.4 ± 0.2 (p)	2432 ± 181 (p)
Santa Ponza	8	90	0.4 ± 0.06 (p)	nd	nd	nd	nd	nd
Milazzo	4	90	3 ± 1.8 (p)	3220 ± 185 (p)	5	172 ± 21.2	1.5 ± 0.06 (p)	2932 ± 360 (p)
Civitavecchia	8	99 ± 14.1	2.1 ± 0.4 (p)	3981 ± 276 (p)	5	166 ± 14.1	3.5 ± 0.22	nd
Santa Manza		nd	nd	nd	8	163 ± 14.1	2 ± 1.3	4554 ± 224 (p)
Savona		nd	nd	nd	8	186 ± 22	1.7 ± 0.26	3719 ± 263 (p)

It was possible to compare the responses of at least 2 different species at 6 stations (Table 1). Milazzo was thus characterized by the highest inductions and Santa Ponza (Balearic Islands) by low inductions for *Mullus barbatus* and *Serranus cabrilla*. The Milazzo site was located next to an oil refinery, the likely source of complex mixtures of specific hydrocarbons. Santa Ponza, situated farther away from urban areas, was characterized by lower inductions of EROD activity.

High inductions were recorded at Civitavecchia for the combers, but at that site the red mullet showed a different sensitivity. Induction for red mullet at Civitavecchia was lower than the highest levels obtained at Ostia and Milazzo (Fig. 1). The highest inductions of EROD activity for the combers were always much lower than those for red mullet (Narbonne et al. 1991).

Only 2 stations, Civitavecchia and Milazzo, allowed comparison of the response of all 3 species sampled (Table 1). The Milazzo station was characterized by high inductions for *Mullus barbatus* and *Serranus hepatus* (Fig. 1).

The Cortiou area, situated at a pilot site for the monitoring of biological effects along French coasts (Bur-

geot et al. 1994a), showed high exposure to pollutants, with induction of EROD activity comparable to that of Civitavecchia (Table 1). Measurements of EROD activity recorded at Cortiou in the monitoring context showed that red mullet and comber were exposed to pollution originating from domestic sewage from the city of Marseille, France (Burgeot et al. 1994a, b). The results for EROD activity at Cortiou ($9 \pm 2.9 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$) were significantly higher ($p = 0.004$) than those at Rio Ter and Sitges (Spain) (3.7 ± 1.7 and $3.9 \pm 0.5 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ respectively) but only half as high as those for Milazzo, Ostia and Barcelona (Table 1). However, the Santa Manza station, despite its location remote from industrial and domestic sources of waste, had an EROD induction activity for red mullet comparable to that of Cortiou. At the Santa Manza station, high induction levels were also noted in October 1991 for *Mullus barbatus* and *Serranus cabrilla*, but no explanation was found for these high values (Burgeot et al. 1994b).

Comparisons among the different stations showed that observations for the target species did not correlate at the different sites.

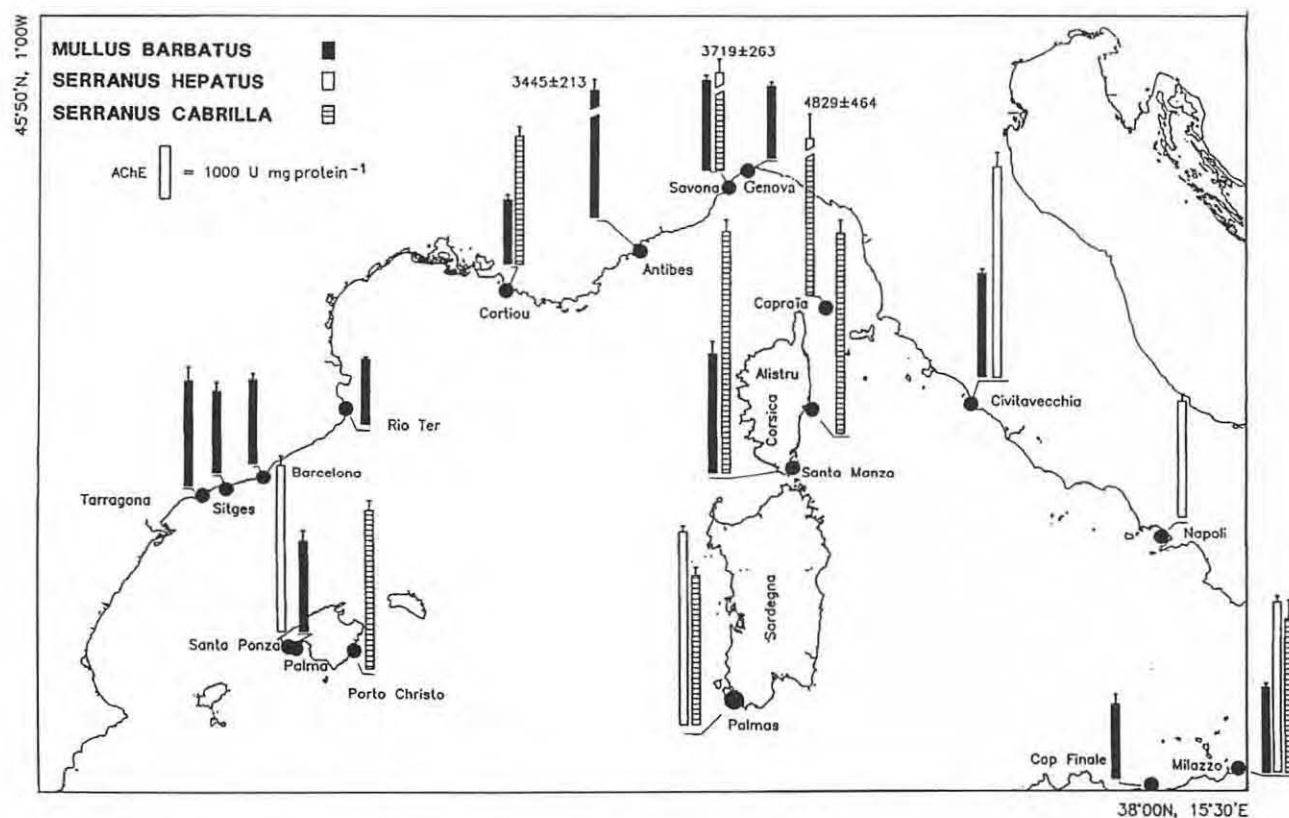


Fig. 2. *Mullus barbatus*, *Serranus hepatus*, *S. cabrilla*. AChE inhibition in muscle tissue. Mean and SD were calculated for 4 replicates per individual fished at the same station

Measurement of AChE activity

The abundance of *Mullus barbatus* at 3 stations provided the opportunity to determine AChE activity in muscle tissue as a function of size. Measurements of AChE activity of 3 species at all stations are reported in Fig. 2. AChE activity in *M. barbatus* was found to be inversely proportional to size. Individuals measuring 160 to 180 mm fished at only 3 stations (Milazzo, Civitavecchia and Santa Manza) had very similar activities close to 1500 U mg protein⁻¹ (1487 ± 94, 1495 ± 77 and 1450 ± 67 respectively), whereas younger individuals measuring 120 to 140 mm showed higher activities. These data are in agreement with observations concerning other species such as the dragonet *Callionymus lyra* and the comber *Serranus cabrilla* (G. Bocquéné, unpubl.). Comparison of AChE activities in individuals measuring 120 to 140 mm showed that the highest values were found at Antibes (France), Santa Manza, Tarragona (Spain) and Civitavecchia; the lowest activities were found at Cortiou, Genoa (Italy), Cap Finale (Sicily), Rio Ter, Sitges and Barcelona (Table 2). The same measurements performed on *S. cabrilla* gave the lowest AChE values at Cortiou (2432 ± 181 U), and the highest at Santa Manza (4554 ± 224) and Capraia Island (4829 ± 464) northwest of Corsica. AChE activities measured in *S. hepatus* were lowest at Naples, Italy (2217 ± 138) and highest at Civitavecchia (3981 ± 276). These figures, like the others, showed a difference in activity of as much as 50% between extreme values, suggesting the presence of inhibitory substances in the biotope of fish sampled at the stations with the lowest activities.

Measurement of antioxidant and GST enzymes

Some similarities were observable with catalase and GST measurement at 5 stations except for Mallorca (Table 3). Both activities tended to be significantly higher at Cortiou, the station close to the outlet of the Marseille waste treatment facility. Lower activity at Mallorca (reference site) was significant with catalase assays. Intermediate values were detected for catalase activity at the other stations. GPX, however, showed a completely different profile, with the highest activities in the fish sampled at Mallorca and Cortiou. SOD and DT-diaphorase activities were similar at all stations, apart from Sitges and Tarragona, which showed the highest activities, respectively.

Table 2. *Mullus barbatus*, *Serranus hepatus* and *S. cabrilla*. AChE inhibition values (U mg prot⁻¹) in muscle tissue. Mean and SD were calculated for 4 replicates per individual fished at the same station. 8 individuals were analysed per station; nd: no data

Station	<i>Mullus barbatus</i>	<i>Serranus cabrilla</i>	<i>Serranus hepatus</i>
Alistru	nd	3786 ± 246	nd
Antibes	3445 ± 213	nd	nd
Barcelona	1564 ± 134	nd	nd
Cap Finale	1427 ± 195	nd	nd
Capraia	4829 ± 464	nd	nd
Civitavecchia	1934 ± 87	nd	3981 ± 276
Cortiou	1225 ± 87	2432 ± 181	nd
Genoa	1357 ± 83	nd	nd
Milazzo	1645 ± 80	2932 ± 360	3247 ± 114
Naples	nd	nd	2217 ± 138
Palma	nd	2851 ± 165	3705 ± 116
Rio Ter	1228 ± 45	nd	nd
Santa Manza	2250 ± 241	4554 ± 224	nd
Santa Ponza	1726 ± 201	nd	3220 ± 185
Savona	1698 ± 105	3719 ± 263	nd
Sitges	1538 ± 169	nd	nd
Tarragona	2012 ± 266	nd	nd

Table 3. Activities of catalase ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$), glutathione peroxidase ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$), superoxide dismutase ($\text{unit min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$), and glutathione S-transferase ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$) in liver tissue of red mullet. NADPH- and NADH-dependent DT-diaphorase activities ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$) in 10000 × g supernatant of red mullet. Values are mean SD (n = 6) significant differences, with respect to Mallorca (*p < 0.05)

Station	Catalase	SOD	GPX	GST	DT-diaphorase	
					NADH	NADPH
Cortiou	1819 ± 197*	8.1 ± 1.7	111.2 ± 11.5*	3063 ± 143*	2.56 ± 0.56*	1.13 ± 0.19*
Barcelona	1217 ± 206*	8.2 ± 1.6	39.1 ± 2.5*	1262 ± 133	2.68 ± 0.46	1.13 ± 0.28
Sitges	1263 ± 252*	14.4 ± 2.0*	60.8 ± 12.2*	1257 ± 369	3.17 ± 0.33	1.60 ± 0.37
Tarragona	1389 ± 122*	11.0 ± 3.3	47.0 ± 5.6*	1435 ± 131	4.03 ± 0.53	2.18 ± 0.19
Mallorca	704 ± 62	8.2 ± 1.0	147.8 ± 12.6	1603 ± 112	2.65 ± 0.23	1.39 ± 0.12

Measurement of DNA adducts

PAH adducts (ELISA)

Immunochemical determination of PAH-DNA adducts was especially effective for specific contaminations. To test this genotoxic marker for monitoring purposes, measurements were performed in areas subjected to high but not specifically identified anthropogenic inputs. The polyclonal serum used was produced by animals immunized with BPDE-I-DNA. This antibody does not recognize free BPDE molecules. The diol-epoxide guanine N₂ adducts of PAH other than benzo[a]pyrene, such as chrysene and benz[a]anthracene (BaP), possess a stereochemistry close to that of BPDE and are thus capable of being quantified with the BPDE-I-DNA antisera. For this reason, the method allows the assaying of the class of PAH diol-epoxide DNA adducts but data is expressed in BPDE-I-DNA equivalents.

Adducts were measured at only 10 stations because of sampling constraints (Table 1). More than 10 diol-epoxide PAH adducts per 10⁸ nucleotides were observed in red mullet DNA at Barcelona, Milazzo, Cap Finale, Ostia and Savona (Italy). In general, higher quantities of adducts were measured at Savona, Barcelona and Milazzo (Table 1), although the greatest

amount was assayed at Cap Finale (20.8 adducts per 10⁸ nucleotides). EROD activity was highest near the oil refinery at Milazzo, which would appear to be a major source of PAH input (Fig. 1). Measurement of 12.8 adducts per 10⁸ nucleotides in red mullet livers at Savona was indicative of PAH exposure.

No correlation was found between PAH adducts and EROD measurements in red mullet, confirming studies in trout (Masfaraud et al. 1992). However, quantities above 10 adducts per 10⁸ nucleotides were observed at stations with maximal EROD inductions (Barcelona, Ostia and Milazzo; Table 1). Although there were no direct correlations between adducts and EROD activities, the trend observed would indicate that organisms were exposed to complex mixtures of xenobiotics metabolized by enzymatic catalysis and accumulated in the form of PAH-DNA adducts.

³²P-postlabeling PAH adducts

Adduct measurements in red mullet livers by the ³²P DNA postlabeling method allowed adduct profiles to be determined nonspecifically (Table 1). The postlabeling method showed the presence of 4 to 9 specific adducts per station and a total of 20 different adduct substances over all individuals (Fig. 3). Four to 9 dis-

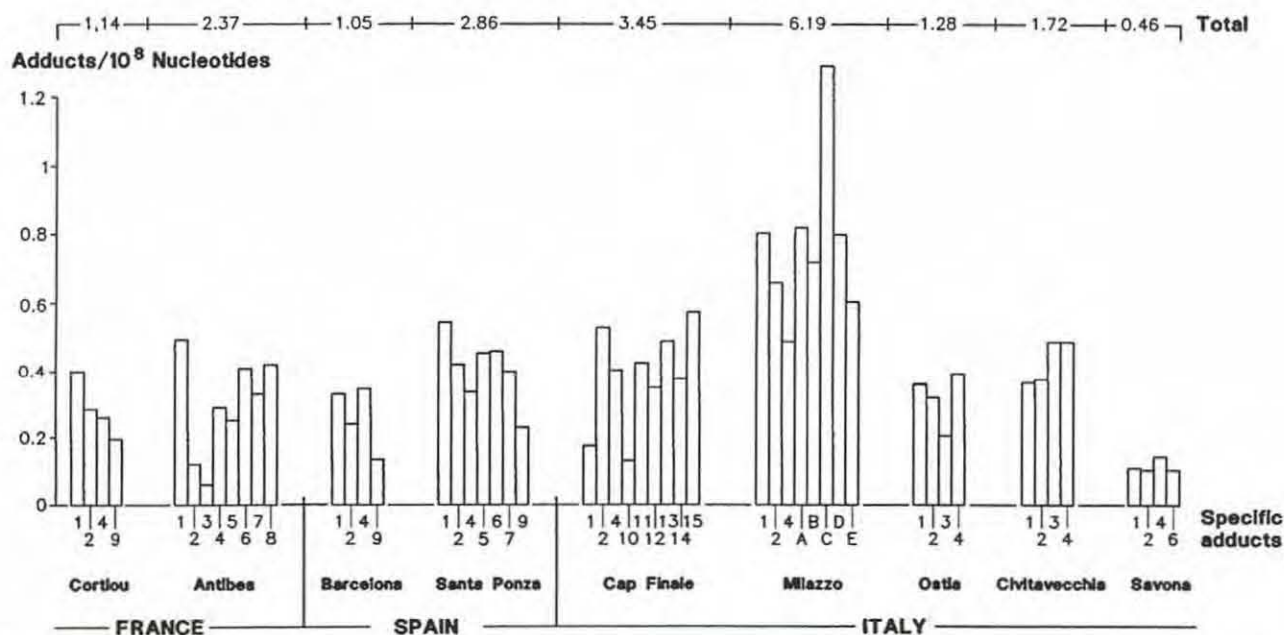


Fig. 3. *Mullus barbatus*. Profile of the different adducts measured by ³²P-postlabeling technique in liver tissue at 9 of the 11 stations sampled (see Table 1). Apart from BPDE, designated by the number 1 as guanine N₂ adducts, the other adducts were not identified. Their quantification is arbitrarily designated by numbers ranging from 1 to 15. Adducts designated by letters have not been identified in freshwater fish, whereas numbers designate adducts common to freshwater fish (carp) and seafish. Letter and number designations correspond exclusively to the experience of the laboratory in which the analysis was performed

tinct adducts were also identified by this analytic method in the mullet *Mugil auratus* from the Adriatic Sea (Kurelec & Gupta 1993). The Cap Finale (9 different adducts), Milazzo (8) and Antibes (8) stations had the richest adduct profiles, while 7 different adducts were identified at Santa Ponza. Similar profiles with 4 adducts were obtained at the Cortiou, Barcelona, Ostia and Civitavecchia stations. No adducts were found at Santa Manza and Genoa. The number of different adducts observed was not systematically indicative of a large quantity of total adducts. Nine different adducts and 3.5 adducts per 10^8 nucleotides were identified at Cap Finale versus 8 and 6.2 adducts per 10^8 nucleotides at Milazzo (Fig. 3). The Cortiou site, though directly influenced by domestic waste input, showed relatively few different adducts.

A very marked difference was noted between the minimum total adducts at Savona (0.5 adducts per 10^8 nucleotides) and the maximum at Milazzo (6.2 adducts per 10^8 nucleotides). EROD activity and adduct measurements (ELISA and ^{32}P), though not correlated, showed a common trend toward high values at Milazzo; a large quantity of PAH adducts was observed by using the 2 measurement techniques at Cap Finale. However, the results obtained at Savona

for the 2 techniques showed different trends. Quantities above 10 adducts per 10^8 nucleotides were noted with the diol-epoxide assay method (ELISA), whereas the lowest total adduct quantity was measured at Savona by the ^{32}P method (Table 1). The BPDE adduct, present in a majority of mammals and the only adduct identified by the postlabeling method in fish, was quantified at all sampling sites by the ^{32}P technique.

Chemical measurements of PAHs in total sediment

Preliminary analytic results of PAHs (Table 4) for a fraction of total sediment enabled us to classify the sampling stations into 3 categories (Fig. 4): those with total PAH of less than 200 ng g^{-1} (Santa Manza, Santa Ponza, Cap Finale, Milazzo and Antibes); those between 894.39 and $3058.46 \text{ ng g}^{-1}$ (Barcelona and Savona); and those between 19371 and $37507.5 \text{ ng g}^{-1}$ (Genoa & Cortiou).

Surface sediments sampled near large cities at depths of 20 to 76 m allowed identification and quantification of PAH compounds of essentially pyrolytic origin.

Table 4. PAH distribution in total sediment (<2 mm). Concentrations are expressed in ng g^{-1} . Abbreviations for PAHs are explained in Fig. 5 legend

	Station								
	Santa Manza	Santa Ponza	Cap Finale	Milazzo	Antibes	Barcelona	Savona	Genoa	Cortiou
DBT	0.290	0.329	0.406	1.48	0.59	5.15	14.78	125.6	352.5
MBTs	0.614	0.967	1.003	6.77	1.32	6.72	8.31	71.9	398.7
Phe	3.555	2.239	3.214	9.04	6.26	74.81	245.53	2127.0	4047.6
MPs	2.958	2.817	3.048	30.90	5.80	65.03	80.92	687.7	1515.7
DMPs	2.939	4.278	3.215	42.65	5.03	51.54	37.02	370.6	906.1
An	1.510	0.539	0.993	0.64	2.36	15.23	51.18	637.0	994.2
Flt	7.726	3.060	7.272	9.62	20.30	119.19	506.67	3271.8	5141.0
Pyr	7.138	2.814	6.421	11.85	17.17	101.21	396.30	2309.0	4194.0
BaA	7.676	2.654	4.845	3.73	12.10	53.50	214.75	1432.9	2758.5
Chr	8.342	3.277	5.628	18.96	13.90	67.98	242.13	1508.0	3153.9
B(j+b)F	8.938	3.910	4.732	6.11	12.81	51.43	209.47	1345.6	2320.7
BkF	7.998	3.223	4.987	3.21	12.27	46.61	175.16	844.9	426.9
BeP	6.013	2.655	4.068	11.54	10.14	47.91	168.94	879.7	1641.3
BaP	8.628	3.541	5.172	3.81	12.53	49.39	205.96	1162.5	1780.9
Per	2.279	0.994	1.982	2.09	3.60	20.29	55.97	283.8	481.8
InP	6.157	3.212	4.619	3.33	10.57	33.30	129.02	634.1	1540.9
BghiP	5.803	2.905	4.486	5.72	10.64	29.75	111.13	517.0	1531.3
dBahA	2.935	1.161	1.968	2.20	3.070	9.240	038.03	0197.5	533.7
Total	92	44.6	68.1	174	160	848	2891	18407	35209
MDBTs/DBT	1.13	1.30	2.94	2.47	4.57	2.12	0.57	0.56	2.24
(MPs + DMPs)/Phe	0.60	1.56	3.17	1.95	8.13	1.66	0.50	0.48	1.73
BeP/BaP	0.92	0.97	0.75	0.79	3.03	0.70	0.76	0.82	0.81
Chr/BaA	1.14	1.27	1.23	1.16	5.08	1.09	1.05	1.13	1.15
BghiP/InP	0.99	0.89	0.90	0.97	1.71	0.94	0.82	0.86	1.01
Phe/An	4.1	4.9	4.2	3.2	14.1	2.4	0.3	4.8	2.7

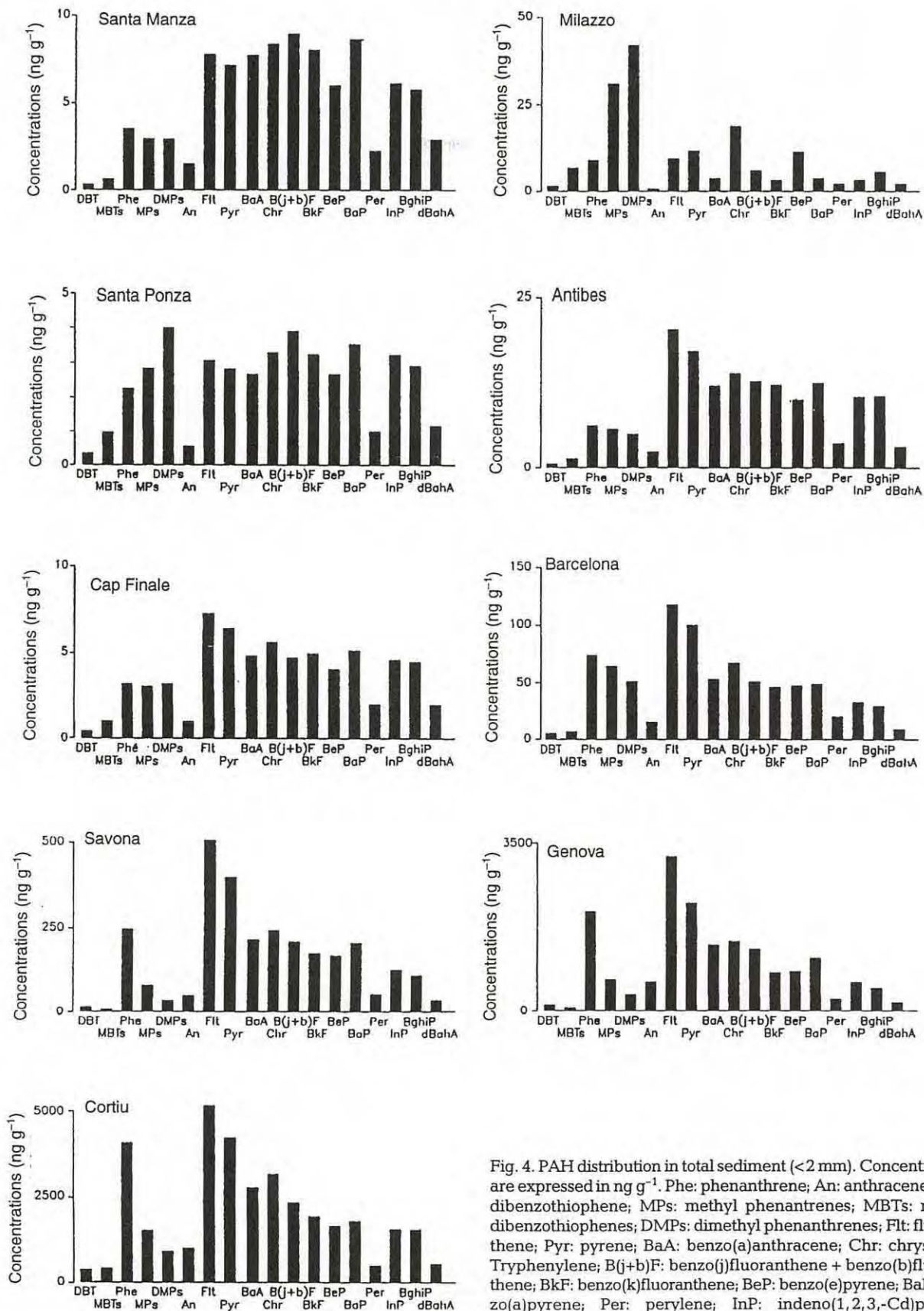


Fig. 4. PAH distribution in total sediment (<2 mm). Concentrations are expressed in ng g^{-1} . Phe: phenanthrene; An: anthracene; DBT: dibenzothiophene; MPs: methyl phenantrenes; MBTs: methyl dibenzothiophenes; DMPs: dimethyl phenanthrenes; Flt: fluoranthene; Pyr: pyrene; BaA: benzo(a)anthracene; Chr: chrysene + Tryphenylene; B(j+b)F: benzo(j)fluoranthene + benzo(b)fluoranthene; BkF: benzo(k)fluoranthene; BeP: benzo(e)pyrene; BaP: benzo(a)pyrene; Per: perylene; InP: indeno(1,2,3,-Cd)pyrene; BghiP: benzo(g,h,i)perylene; dBahA: dibenzo-(a,h)anthracene

This contamination is characteristic of the Mediterranean Sea (Raoux 1991, Raoux & Garrigues 1993). Its major components (phenanthrene, fluoranthene and pyrene) are classical representatives of pollution of human origin (Figs. 4 & 5). The lowest values of the structural isomers ratio (Chr/BaA; BeP/BaP; BghiP/InP

and Phe/An; abbreviations defined in Fig. 4 legend) regularly used to identify petrogenic from pyrolytic origin (Sicre et al 1987) showed that the sediment was contaminated by compounds with anthropogenic origins at the majority of the sampling stations. The highest values ratio was observed at Milazzo (Fig. 5).

The Milazzo station displayed a characteristic pattern of pollution due to petroleum, which presumably originated the neighbouring oil refinery. In Milazzo methyl and dimethyl phenanthrene concentrations were more elevated than at the other stations (Table 3).

The ratios between alkylated and parent compounds for phenanthrene (MPs + DMPs)/Phe and dibenzothiophene MDet/DBT were elevated. They characterized the prevalence of alkylated compounds in the case of petrogenic contamination. The maximum ratio was observed at Milazzo. A peak with a low intensity was also observed at Santa Ponza with an alkylated compounds ratio, though it was not detectable with the other ratios studied (Fig. 5).

DISCUSSION

This scientific cruise was conducted in the vicinity of large and medium-sized cities of the northwestern part of the Mediterranean Sea which are impacted by industrial and domestic pollution. Pollutant evaluation of the marine environment was performed according to a multi-marker approach. Three different categories of bioindicators have been developed to diagnose the biological and genotoxic effects of pollutants. EROD has been recommended for national and international biomonitoring programs and AChE and DNA adducts for local studies or those with a particular objective. The third category, antioxidant enzymes, includes biomarkers which require additional research before monitoring applications can be undertaken (ICES 1994).

These different indicators of exposure to xenobiotics were investigated in 3 target species of fish previously studied in the Mediterranean Sea (Mathieu 1990, Narbonne et al. 1991, Sanchez et al. 1993, Burgeot et al. 1994a, b). The results show that these bioindicators gave different res-

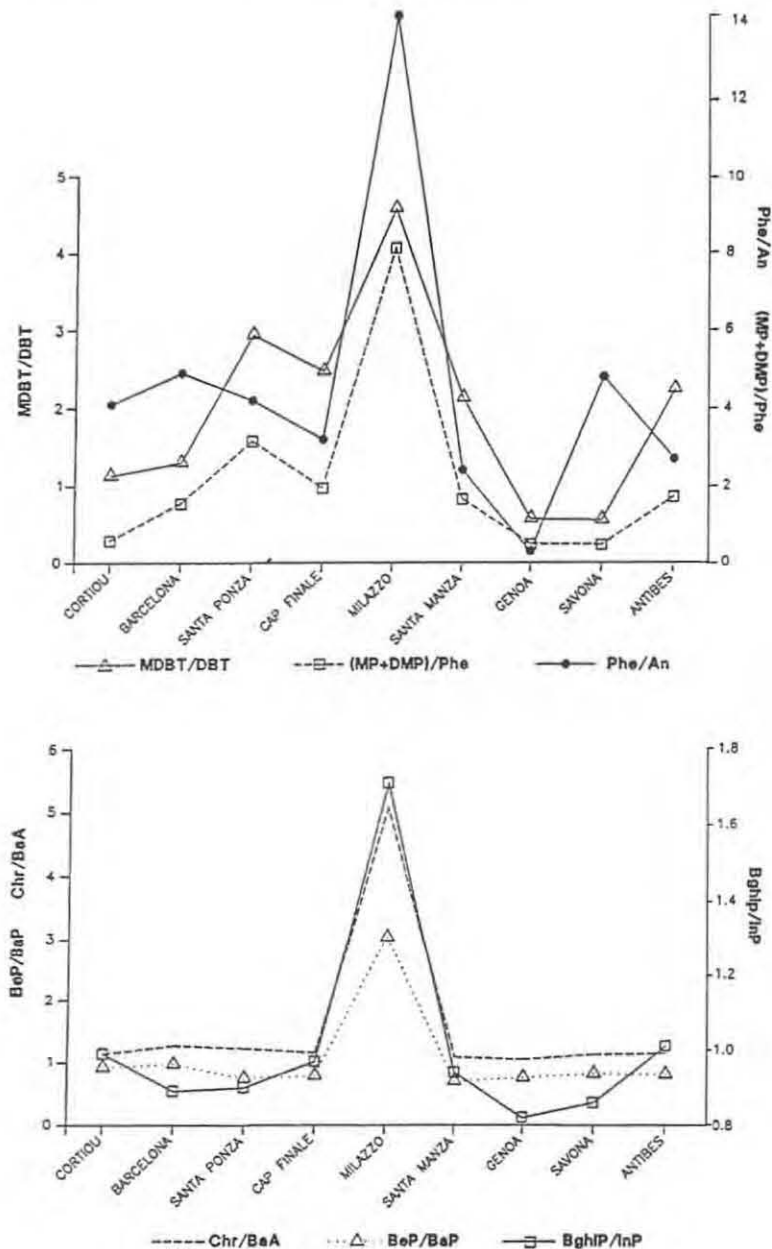


Fig. 5. Ratio of structural PAH isomers. Chemical measurement of PAH in surface sediment indicates the pyrolytic origin of this contaminant for all stations except Milazzo (petroleum origin). MDet/DBT: methyl dibenzothiophene/dibenzothiophene; (MP+DMP)/Phe: (methyl phenanthrene + dimethyl phenanthrene)/phenanthrene; Phe/An: phenanthrene/anthracene; Chr/BaA: chrysene/benzo(a)anthracene; BeP/BaP: benzo(e)pyrene/benzo(a)pyrene; BghiP/InP: benzo(g,h,i)perylene/indeno 1,2,3-Cd)pyrene

ponses according to site. EROD and AChE measurements allowed us to obtain information about the exposure state for each fish species (Figs. 1 & 2). Observations obtained by the simultaneous use of these tests provided more consistent data, allowing a first evaluation to be made.

EROD

The EROD study focused on the red mullet *Mullus barbatus* because hepatic capacities of this species are better expressed by EROD variation than are those of the combers *Serranus hepatus* and *S. cabrilla* (Funari et al. 1987, Mathieu 1990). The highest inductions of EROD activity for combers were much lower than those for red mullets (Narbonne et al. 1991). The red mullet can also be trawl-fished, allowing more rapid and extensive sampling (Burgeot et al. 1994b). Inductions of EROD activity in red mullet at the Barcelona, Ostia and Milazzo stations were 2 to 3 times higher than those at other stations, indicating the presence of significant contaminant concentrations. Inductions of EROD activity at the Cortiou and Santa Manza stations were slightly lower but significant (Table 1). The distance from the source of pollution can influence the exposure level of fish, but it is very difficult to interpret this phenomenon on a large geographical scale. The geographical situation of the station is primarily set by trawl-fishing feasibility and characteristics of the ocean bottom. In order to more precisely interpret EROD variation in different areas in the future, this factor of variation must be more closely considered.

The 2 comber species, which have a different way of life than that of the red mullet, showed particularly high inductions at the Cortiou, Civitavecchia and Milazzo stations. Red mullet is more sensitive than comber to EROD activity, and induction is rapid. However, the activity is subject to seasonal variations (Mathieu 1990). EROD activity in males, in particular, is intensely expressed in May during the breeding period. During our study in April, we observed an increase in gonad maturation between the Cortiou station (sampled 10 d earlier) and the Cap Finale station, in conjunction with a 4°C increase in water temperature. As the sexual maturation factor influencing EROD activity can hinder interpretation of results, a multimarker approach is desirable to compensate for this type of problem. PAH measurements in sediment and DNA adduct measurements in liver tissue can provide complementary data on the origins and genotoxic impact of PAH. The identification of individual PAH in sediment can facilitate the determination of specific compounds responsible for biological effects.

AChE

Organophosphorus insecticides and carbamates are currently considered to be the most powerful cholinesterase inhibitors. Most of these substances induce significant inhibitions at concentrations in water of between 0.1 and 1 ng l⁻¹. The presence of these substances in Cortiou station sediments was probably due to the proximity of the outlet for waste waters from the Marseille urban area (with 3.5 million inhabitants), although it is difficult to be certain in the absence of precise chemical data.

In general, the highest values of AChE were measured in areas free of notable industrial or agricultural contamination (south Corsica, Capraia Island), whereas the lowest values were observed in highly contaminated sites (Gulf of Genoa, Cortiou, Naples, Barcelona). Data are scarce on the concentrations of organophosphorus and carbamate compounds in the different marine compartments. However, organophosphorus levels of up to 300 ng g⁻¹ in fish tissue have been measured in the Ebro delta south of Barcelona (Barceló et al. 1990, UNEP/WHO 1991). Traces of ethylparathion and malathion have been detected in Camargue drainage water in France. Analytic problems make it difficult to obtain data on the presence of these substances in the marine environment because each substance must be identified individually. About 40 different organophosphorus compounds and about 20 distinct carbamates were used in France in 1993. Evaluation of organophosphorus and carbamate concentrations is thus extremely difficult, and the risk of underestimation is great. Moreover, a recent study (Bocquéné et al. ■) confirmed the highly synergic effects of associated organophosphorus and carbamates. All this information on the sensitivity and specificity of the cholinesterase target and the synergy of inhibitory effects makes it likely, in the absence of chemical data, that there are inhibitory effects related to organophosphorus and carbamates in coastal marine sediment.

Antioxidant and GST enzyme measurement

Induction of antioxidant and GST enzymes were measured in *Mullus barbatus* liver tissue at 5 stations along the French and Spanish coasts to demonstrate alterations due to the presence of free radicals from pollutant metabolism (Table 3). Although relations between deaths or the existence of neoplasms and alterations in oxidative stress have not yet been clearly elucidated, inductions of antioxidant enzyme activities during exposure to PAHs and PCBs or even fungicide xenobiotics have been observed in flatfish (Chipman et

al. 1992). However, overall responses are quite variable (Livingstone et al. 1992).

Catalase and GST were highest at the most contaminated area, which appeared to be a pollutant-related response, particularly for catalase. In contrast, GPX showed elevated activities at Cortiou (highly polluted) and surprisingly, at Mallorca (clean sea), indicating that factors other than pollution may influence this enzyme. Similar varying results were described by Mather-Mihaich & DiGuilio (1991b), who reported a dose-related increase in catalase activity with no change in SOD or GPX in liver tissue of the catfish *Ictalurus punctatus* exposed to bleached kraft mill effluent.

No elevation of DT-diaphorases or SOD activity was evident at Cortiou. However, DT-diaphorase, NADH- and NADPH-dependent, were maximal at Tarragona and in areas where oil-related activities occur. In mammals, this enzyme appeared to be linked with cytochrome P450 IA1, but very little is known about this in fish. Moreover, the assay conditions may not be the best ones to measure its activity. The degree of inhibition by dicumarol of NADPH- or NADH-dependent DCPIP reductase activity in *Mullus barbatus* is generally low and variable (0.8 to 16%) as reported by Livingstone et al. (1990) for *Limanda limanda*.

From these results, we conclude that the use of antioxidant enzymes alone as biomarkers of oxidative stress is far from sufficient (Peters et al. 1994). However, an integrated approach with sets of different biomarkers of exposure (e.g. EROD) or damage (e.g. DNA adducts), plus detailed chemical characterization of the sampling sites, would contribute to an evaluation of the biological effects of pollutants in the marine environment.

PAH in sediment

PAH measurements in sediment allowed us to define the origins of specific pollutants at each site. Two sources of oceanic PAH pollution are classically noted: natural continental sources and anthropogenic sources. The profiles obtained in the vicinity of large cities are characteristic of compounds of anthropogenic origin. In our study, the PAH contamination patterns in surface sediments were generally very similar, except at the Milazzo station, which had high levels of methyl and dimethyl phenanthrene (Fig. 4). These 2 compounds are fairly representative of petroleum-induced pollution, which appeared due to the presence of an oil refinery in that area. At the other stations, the major role of phenanthrene, fluoranthene and pyrene compounds was indicative of the pyrolytic contamination characteristic of areas of industrial and urban activity.

The expression of total PAH showed 3 contamination trends. Maximum contamination was registered at Cortiou (Table 4), a station situated several meters from the outlet for urban waste from Marseille. Concentrations for parent PAH currently analyzed were in the same range at the Barcelona, Savona, Genoa and Cortiou stations as those in the Ebro delta in Spain (Albaigés et al. 1982) or in regions along the Spanish coast situated near urban areas (Albaigés et al. 1984). However, results at the Cortiou station were far higher than those measured between Marseille and the Rhône delta in southern France (Mille et al. 1981, 1982) or even those obtained within the Rhône delta (230 to 1720 ng g⁻¹) (Milano et al. 1986). Nonetheless, interpretation of the distribution pattern for total PAH, considered as evidence for the identification of pollutant origin, is still difficult. All these results indicate the need for a more thorough study of the environmental geochemistry and specific activities at each site. However, these results show that the stations studied are subjected mainly to contamination of pyrolytic origin, except for Milazzo, which is subjected to characteristic inputs of petroleum products.

DNA adducts

Measurements of DNA adducts by ³²P-postlabeling enabled us to determine the presence of adducts without identifying them singularly (except BPDE-I-DNA) (Fig. 3). PAH diol epoxide-DNA adducts were the only adducts which could be identified by the immunochemical method.

The profiles of DNA adducts obtained allowed for differentiation of specific contamination features among sites probably subjected to human pollution sources, but also to different natural variables such as temperature, water depth and environmental oxygen pressure which can influence PAH transformation in the marine context. Assays of BPDE adducts by the ³²P method showed that BPDE was present at all stations, but at varying concentrations (Fig. 3). Quantification of BPDE-I-DNA equivalents by ELISA allowed us to observe wide variations between the different sites (Table 1).

The complementary data obtained by the 2 methods are useful for evaluating the genotoxic effect of PAH. PAH-DNA measurements, currently used in human monitoring as an indicator of pollution (Poirier et al. 1980), have been compared with the ³²P-postlabeling method performed on humans (Schoket et al. 1993). Like our results for fish, this comparison exercise on humans allowed us to observe the lowest values with the ³²P-postlabeling method in spite of a larger measurement adduct spectrum than that of the ELISA method. The discordance observed between the

2 methods could be due to the DNA extraction method used. An insufficient selective DNA extraction with the ELISA method could induce the detection of RNA adducts and an overevaluation of DNA adducts. A cross reaction with PAHs possessing the same stereochemistry as BaP could be quantified by ELISA and not by ^{32}P -postlabeling because of their small size. Lastly, loss of adducts could be improved during the enrichment phase with P1 \blacksquare nuclease. P1 nuclease could involve an 80% loss of adducts on the C₈ of the guanine (A. Phfol-Leszkowicz unpubl.).

However, further studies using the 2 measurement methods (^{32}P -postlabeling and the immunochemical assay) in relation with PAH chemical measurements in sediment should be performed to facilitate the interpretation of results, a process which is often difficult and related to seasonal variations (Kurelec & Gupta 1993). The use of markers such as BPDE-I-DNA equivalents indicates that the exposure of fish to complex PAH mixtures results from superimpositions of emissions from several sources (Lipiatou 1989). For example, large quantities of PAH-DNA adducts were recorded at the Milazzo site with both methods. The high EROD activity measured at this same site suggests that fish living there are exposed to heavy pollution and to bioactive chemical substances. The Cap Finale site, which had a very rich DNA adduct profile with the ^{32}P method, also showed high amounts of PAH-DNA with the ELISA method. Although PAHs represent only a small fraction of the complex mixtures of petroleum hydrocarbons in the environment, these results suggest that adduct measurements are more particularly effective at sites highly contaminated by PAH (Dunn et al. 1987, Stein et al. 1992). These studies confirm other *in vivo* experiments (Maccubin 1994) which support the contention that the sediment is a possible source for at least some of the genotoxic chemicals to which the fish are exposed. But the ultimate use of the 2 DNA adduct assay methods for monitoring purposes require further studies to evaluate their interest for the monitoring of the marine environment.

In the perspective of genotoxic studies, the monitoring of DNA adducts in fish livers could provide an interesting tool for observing genetic alterations related to long-term exposure. The poor capacities for repair of DNA alterations in fish (Dunn et al. 1987) indicate that data are required concerning the different exposure possibilities. The formation of DNA adducts is a key phase in the onset of cancer, providing a link between genetic mutations in fish livers and the genotoxic effect of chemical substances in the marine environment. Even though adducts have been included among the useful exposure biomarkers for the monitoring of the aquatic environment, certain factors are capable of introducing confusion. The for-

mation of adducts in unpolluted areas, seasonal variations in their formation (Kurelec & Gupta 1993) and the mechanisms of DNA repair dependent on exposure time need to be considered before any attempts are made to interpret carcinogenic effects in environmental monitoring. Another difficulty in field study is the route and the duration of exposure of wild fish to a complex mixture of pollutants. In spite of this difficulty, the concordance of data observed at the Milazzo site, which showed very strong enzymatic EROD activity as well as a high amount of DNA adducts in *Mullus barbatus* liver tissue, indicates the sensitivity of these biomarkers to the sediment contaminated by petroleum products.

In conclusion, the results obtained here suggest that the complementary use of several indicators of biological and genotoxic pollution facilitates evaluation of the state of exposure of these organisms to complex mixtures of chemical pollutants. *Mullus barbatus* were proven suitable for bioindicator analysis. Exposure to insecticides or hydrocarbons were identifiable at the most contaminated sites by using enzymatic bioindicators (EROD and AChE). The identification of individual PAHs in sediment can facilitate the determination of specific compounds responsible for biological effects. For this initial field study, the choice of areas in the northwestern Mediterranean Sea near large cities provided a preliminary estimation of genotoxic alterations revealed by DNA adduct assays. The application of parameters recommended by the international community (ICES and MED-POL) to sensitive sites, the use of a multimarker approach and the assaying of PAH in sediment provided experience and data which will be beneficial to the future use of certain bioindicators for long-term monitoring.

With respect to field studies, more work is needed in identifying the adducts observed in wild fish, especially for the complex pattern observed by using ^{32}P -postlabeling. In order to complete the multimarkers approach, it would be interesting to estimate tumors and neoplasia in wild fish combined with the evaluation of critical genetic targets of DNA adducts such as tumors, suppressor genes and oncogenes.

Acknowledgements. We thank Dr Tie Lang Young from Columbia University, USA for his participation in DNA adduct measurements. We are grateful for L. Giboire's assistance with the figures and to M. J. Thébaud for secretarial assistance.

LITERATURE CITED

- Albaigés J, Algaba J, Bayona JM, Grimalt J(1982) New perspectives in the evaluation of anthropogenic inputs of hydrocarbons in the western Mediterranean coast. VI^{ème} journées d'études des pollutions, Cannes, Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la Mer

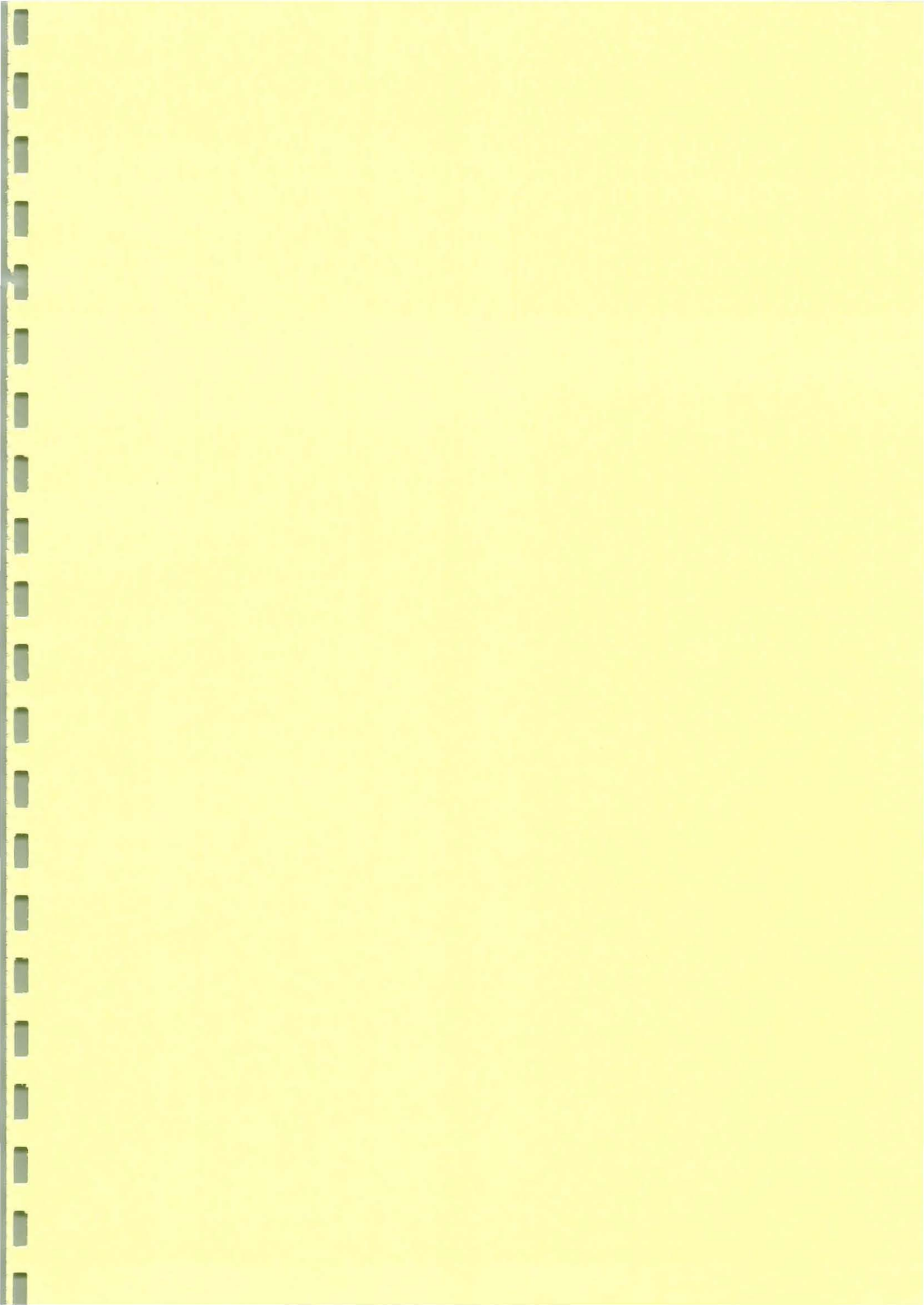
- Albaigès J, Grimalt J, Bayona JM, Risebrough R, De Lappe B, Walker W (1984) Dissolved, particulate and sedimentary hydrocarbons in a deltaic environment. *Org Geochem* 6:237-248
- Baird WM (1979) The use of radioactive carcinogens to detect DNA modifications. In: Grover PL (ed) *Chemical carcinogens and DNA* 59. CRC Boca Raton, FL, p ■-■
- Barceló D, Porte C, Cid J, Albaigès J (1990) Determination of organophosphorus compounds in coastal environments by gas chromatography nitrogen phosphorus and main spectrometric detection. *Int J environ analyt Chem* 38:199-209
- Beliaeff B, Burgeot T (■) Biomonitoring in the marine environment: estimation of EROD activity in fish and power studies. *Can J Fish aquat Sci* ■
- Benson AM, Hunkler MJ, Talalay P (1980) Increase of NAD(P)H: quinone reductase by dietary antioxidants. Possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. *Proc nat Acad Sci USA* 77:5216-5220
- Bocquéné G, Bellanger C, Cadiou Y, Galgani F (1994) Joint action of combinations of pollutants on the acetylcholinesterase activity of several marine species. *Ecotoxicology* ■
- Bradford M (1976) A rapid method quantification of protein utilising the principle dry binding. *Analyt Biochem* 72:248-264
- Burgeot T, Bocquéné G, Pingray G, Godeffroy D, Legrand J, Dimeet J, Marco F, Vincent F, Henocque Y, Oger Jeanerret H, Galgani F (1994a) Monitoring biological effects of contamination in marine fish along French coasts by measurement of ethoxyresorufin-O-deethylase activity. *Ecotoxicol environ Saf* 4:131-147
- Burgeot T, Bocquéné G, Truquet P, Le Dean L, Galgani F (1994b) Induction of EROD activity in red mullet (*Mullus barbatus*) along the French mediterranean coasts. *Sci total Environ* 142:213-220
- Burke MD, Mayer RT (1974) Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by β -methylcholanthrene. *Drug Metab Dispos* 2:583-588
- Chipman JK, Marsh JW, Livingstone DR, Evans B (1992) Genetic toxicity in dab *Limanda limanda* from the North Sea. *Mar Ecol Prog Ser* 91:121-126
- Dawe CJ, Stanton MF, Schwartz FJ (1964) Hepatic neoplasms in native bottom-feeding fish of Deep Creek Lake, Maryland. *Cancer Res* 24:1194
- DiGiulio RT, Washburn PC, Wennig RJ, Jewel GW (1989) Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environ Toxicol Chem* 8: 1103-1123
- Dunn BP, Balck JJ, Maccubbin A (1987) 32 P-postlabeling analysis of aromatic DNA adducts in fish from polluted water. *Cancer Res* 47:6543-6548
- Ellman GL, Courtney KO, Andres V, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88-95
- Ericson G, Liewenborg B, Balk L (1995) Comparative 32 P-postlabeling analysis of DNA adducts in perch (*Perca fluviatilis*) from unpolluted polluted areas in Swedish coastal water. *Mar environ Res* 39:303-307
- Förlin L, Andersson T (1985) Storage conditions of rainbow trout liver cytochrome P450 and conjugating enzymes. *Comp Biochem Physiol* 80B:569-572
- Funari E, Zoppini A, Verdina A, De Angelis G, Vitozi L (1987) Xenobiotic-metabolizing enzyme systems in test fish: I. Comparative studies of liver microsomal monooxygenases. *Ecotoxicol environ Saf* 13:24-31
- Galgani F, Bocquéné G (1989) Utilisation des lecteurs de microplaques pour les mesures colorimétriques et enzymatiques. *Océanis* 15:443-441
- Galgani F, Payne J (1991) Biological effects of contaminants: microplate method for measurement of ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) in fish. *Technique in marine environmental sciences*. Int Counc Explor Sea, Palaegade 2-4, Copenhagen
- GICBEM (groupe interface chimie biologie écosystèmes marins) (1992) Activités des systèmes de bioprotection d'organismes marins représentatifs d'écosystèmes benthiques côtiers. Rapport final à la commission des communautés européennes (DG XII-B-2). Faculté de Nice, contrat de recherche EV4V 0163-F (EDB)
- Greenwald RA (1985) *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press, Boca Raton, FL
- Grzebyk D, Galgani F (1991) Measurement of organic pollution in marine organisms. Rapid determination of EROD induction using plate readers. *Aquat Living Res* 4:53-59
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974). Glutathione S-transferase. *J biol Chem* 25:7130-7139
- ICES (International Council for the Exploration of the Sea.) (1994) Report of the working group on the biological effects of contaminants. CM 1994/ENV: 3 Ref. general secretary, Pleagade 2-4., 1261, Copenhagen
- Kurelec B, Gupta ■ (1993) Biomonitoring of aquatic systems. In: Phillips DH, Castegnaro M, Bartsch H (eds) *Postlabelling methods for detection of DNA adducts*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, p 365-372
- Lipiatou E (1989) Contribution à l'étude géochimique des hydrocarbures aliphatiques et aromatiques dans le delta du Rhône et le golfe du Lion. Thèse de Doctorat de l'Université de Paris 6
- Lipiatou E, Saliot A (1992) Biogenic aromatic hydrocarbon geochemistry in the Rhone River delta in surface sediments from the open northwestern Mediterranean Sea. *Estuar coast Shelf Sci* 34:515-531
- Livingstone DR, Archibald S, Chipman KL, Marsh JW (1992) Antioxidant enzymes in liver of dab *Limanda limanda* from the North Sea. *Mar Ecol Prog Ser* 91:97-104
- Livingstone DR, Garcia-Martinez P, Michel X, Narbonne JF, O'Hara S, Ribera D, Winston G.W (1990) Oxyradical generation as pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and other molluscs. *Funct Ecol* 4:415-424
- Lowry OH, Rosebrough NJ., Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J biol Chem* 193:265-275
- Maccubbin AE (1994) DNA adduct analysis in fish: laboratory and field studies. In: *Molecular, biochemical, and cellular perspectives*. *Aquat Toxicol*, CRC Press, Boca Raton, FL, ■, p 267-294
- Markovics B, Witas H, Gabrielak T, Szabo L (1987) Paraquat as an agent affecting antioxidant enzymes of common carp erythrocytes. *Comp Biochem Physiol* 87C:217-219
- Masfaraud JF, ■Pfohl-Leszkowicz A, Malaveille C, Keith G, Monod G (1992) 7-ethoxyresorufin-O-Deethylase activity and level of DNA adducts in trout treated with benzo(a)pyrene. *Mar environ Res* 34:351-354
- Mather-Mihaich E, DiGiulio RT (1991a) Antioxidant, mixed-function oxidase and peroxisomal responses in channel catfish exposed to DEF and N-butyl mercaptan. *Comp Biochem Physiol* 85C:427-432
- Mather-Mihaich E, DiGiulio RT (1986) Antioxidant enzyme activities and malonaldehyde, glutathione and methemoglobin concentrations in channel catfish exposed to DEF and N-butylmercaptan. *Comp Biochem Physiol*. 85C: 427-432
- Mather-Mihaich E, DiGiulio RT (1991b) Oxidant, mixed-function oxidase and peroxisomal responses in channel catfish

- exposed to a bleached kraft mill effluent. *Arch Environ Contam Toxicol* 20:391-397
- Mathieu A (1990) Variations des activités de biotransformation chez les poissons marins application à la surveillance biologique de l'environnement. Thèse universitaire, Université d'Aix-Marseille
- McCarthy JF, Jacobson DN, Shugart Lee R, Jimenez BD (1989) Pre-exposure to 3-methylcholantrene increase benzo(a)pyrene adducts on DNA of bluegill sunfish. *Mar Environ Res* 28:323-328
- McCord JM, Fridovich ■ (1969) Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem* 244:6049-6055
- Milano JC, Fache B, Vernet JL (1986) Pollution par les hydrocarbures polycycliques du sédiment, de la flore et de la faune du site du cap Sicié à la sortie de l'émissaire de la ville de Toulon (Côte Méditerranéenne française). *J Rech Océanogr* 11:13-96
- Mille G, Dou H, Christiani G, Giusti G (1981) Hydrocarbures présents dans les sédiments côtiers superficiels méditerranéens I: Etude qualitative et quantitative fine. *Environ Pollut Ser B Chem Phys* 2:437-450
- Mille G, Chen JY, Dou HJM (1982) Polycyclic aromatic hydrocarbons in Mediterranean coastal sediments. *Int J Environ Anal Chem* 11:295-304
- Narbonne JF, Ribera D, Michel X, Raoux C, Garrigues P, Monod JL (1991) Indicateurs biochimiques de contamination de l'environnement marin: étude comparative en mer Méditerranée. *Océanogr* 17:257-275
- Peters LD, Porte C, Albaigés J, Livingstone DR (1994) 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and antioxidant enzyme activities in larvae of sardine (*Sardina pilchardus*) from the north coast of Spain. *Mar Pollut Bull* 5:299-304
- Phfol-Leszkowicz A, Chakor K, Creppy EE, Dirheimer G (1991) DNA-adduct formation in mice treated with ochratoxin A. In: Castegnaro M, Plestina R, Dirheimer G, Chernozemsky IV, Bartsch H, (eds) Mycotoxin, endemic nephropathy and urinary tract tumours. (IARC Scientific publications N° 115), Lyon, International Agency for Research on Cancer, p 245-253
- Phfol-Leszkowicz A, Grosse Y, Kane A, Creppy EE, Dirheimer G (1993) Differential DNA adduct formation and disappearance in three mice tissues after treatment by mycotoxin, ochratoxin A. *Mutat Res* 289:265-273
- Poirier MC, Santella R, Weinstein IB, Grunberg D, Yuspa SH (1980) Quantification of benzo(a) pyrene-deoxyguanosine adducts by radioimmunoassay. *Cancer Res* 40:412-416
- Raoux C (1991) Modélisation du mécanisme de contamination par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) des sédiments marins côtiers de méditerranée: conséquences sur la biodisponibilité des HAP dans le milieu marin. Thèse de Doctorat, Université de Bordeaux
- Raoux C, Garrigues P (1993) Mechanism model of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination of marine coastal sediment from Mediterranean Sea. In: Garrigues P, Lamotte ■ (eds) Polycyclic aromatic compounds: synthesis, properties, analytical measurements, occurrence and biological effects. Gordon and Breach Science Publishers ■, p 443-450
- Reddy MV, Randerath K (1986) Nuclease P1 mediated enhancement of sensitivity of ³²P-postlabeling test for structurally diverse DNA-adducts. *Carcinogenesis* 7: 1543-1551
- Roméo A, Viarengo A, Lafaurie M (1993) Starting of a bio-monitoring programme in the PACA (Provence-Alpes-Côte d'Azur)-Liguria area. Séminaire européen sur les technologies marines et environnement de méditerranée, 4-6 mars 1993, ■, ■, 111-113
- Sanchez J, Solé M, Albaigés J (1993) A comparison of distributions of PCB congeners and other chlorinated compounds in fishes from coastal areas and remote lakes. *Int J Environ Anal Chem* 50:269-284
- Santella RM, Grinberg-Funes RA, Young CD, Singh VN, Wang LW, Perera FP (1992) Cigarette smoking related polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in peripheral mononuclear cells. *Carcinogenesis* 13:2041-2045
- Schocket B, Phillips DH, Poirier CM, Vincze I (1993) DNA adducts in peripheral blood lymphocytes from aluminum production plant workers determined by ³²P-postlabeling and enzyme-linked immunosorbent assay. *Environ Health Perspect* 99:307-309
- Sicre MA, Marty JC, Saliot A, Aparicio X, Grimalt J, Albaigés J (1987) Aliphatic and aromatic hydrocarbons in different sized aerosols over the Mediterranean Sea: occurrence and origin. *Atmos Environ* 21:2247-2259
- Sikka HC, Steward AR, Kandaswami C, Rutkowski JP, Kumar S, Zaleski J, Early K, Gupta RC (1991) Metabolism of benzo(a)pyrene and persistence of DNA adducts in the brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*). *Comp Biochem Physiol* 100C:25
- Stein JE, Collier TK, Reichert WL, Castillas E, Hom T, Varanasi U (1992) Bioindicators of contaminant exposure and sublethal effects: studies with benthic fish in Puget Sound, Washington. *Environ Toxicol Chem* 11: 701-714
- Stein JE, Reichert WL, French B, Varanasi U (1993) ³²P-post-labeling analysis of DNA adduct formation and persistence in English sole (*Pleuronectes vetulus*) exposed to benzo(a)pyrene and 7H-dibenzo[c,g]carbazole. *Chemo-Biol Interactions* 88:55-69
- UNEP/WHO (1991) Biogeochemical cycles of specific pollutants (activity K): final report on project on survival of pathogenic organisms in seawater. MAP technical report series. Num 55, UNEP ■, Athens, p ■-■
- Varanasi U, Nishimoto M, Reichert WL, Ederbart B (1987) Comparative metabolism of benzo(a)pyrene and covalent binding to hepatic DNA in English sole, Starry flounder, and rat. *Cancer Res* 46:3817-3824
- Varanasi U, Reichert WL, Stein JE (1989) ³²P-postlabeling analysis of DNA adducts in liver of wild English sole (*Parophrys vetulus*) and winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Cancer Res* 49:1171-1177

This article was submitted to the editor

Manuscript first received: March 14, 1995

Revised version accepted: June 28, 1995



3-6. Mesure des activités AChE chez la palourde et l'huitre soumises à un traitement au dichlorvos

Les stations d'aquaculture se sont beaucoup développées sur la côte atlantique française et les conditions d'élevage intensif sont la source d'infections parasitaires tenaces. Ces épizooties qui ont ravagé bien des élevages sont traitées, en prévention et en curatif, par des produits vétérinaires parmi lesquels les organophosphorés tels que le métrifonate et le dichlorvos figurent en bonne place. Ces produits sont généralement utilisés en bain prolongé et les effluents de ces traitements sont rejetés dans le milieu. Le métrifonate activé en dichlorvos en milieu aqueux est un inhibiteur puissant des cholinestérases (Høy et al., 1991) et il agit ainsi notamment contre le pou du saumon (*Lepeophtheirus salmonis*). Dès lors la mesure des activités AChE apparaît comme un bon outil de contrôle des effets de ce produit sur les espèces non ciblées.

Le rejet de quantités importantes d'eaux de traitement voire la dispersion directe des OP dans les cages d'élevage en mer sont des sources de contamination et d'accidents fréquents. Nous avons déjà abordé ces problèmes au chapitre consacré aux inhibiteurs avec les accidents liés à l'usage d'organophosphorés dans les fermes d'aquaculture et les travaux de Horsberg et al. (1989) signalent trois épisodes de mortalité importante dans des fermes d'élevage de saumon après usage de trichlorfon et de dichlorvos. Les animaux morts présentaient des inhibitions de 80% de l'activité AChE et une bioaccumulation hépatique de 200 µg/kg.

Sur le littoral, la coexistence de fermes aquacoles et de parcs conchylicoles ne se fait pas toujours sans problème et les rejets de l'aquaculture qu'ils soient liés à des traitements chimiques (antibiotiques et pesticides) ou à des produits de dégradation alimentaire (ammoniaque, nitrites et nitrates) peuvent nuire considérablement aux activités conchylicoles notamment dans leurs phases précoces telles que le captage des embryons de mollusques.

L'objectif de cette étude est donc d'estimer les effets, *in situ*, sur des populations d'huitres (*Crassostrea gigas*) et de palourdes (*Ruditapes philippinarum*) d'un traitement à deux concentrations de dichlorvos par la mesure de l'activité AChE sur ces mollusques.

3-6-1. Matériels et méthodes

Les expériences sont conduites à la ferme aquacole de l'IFREMER de Noirmoutiers. Les huitres (78 ± 5 g) et les palourdes (25 ± 1 g) proviennent

d'élevage locaux exempts *a priori* de problèmes de contamination. Soixante quatre individus de chaque espèce sont placés dans des bacs d'élevage de 2 m³. (A, B et C) dans une eau de mer naturelle. La circulation de l'eau en flux continu est stoppée pendant le traitement des bacs A et B avec respectivement 1 mg/l et 0.1 mg/l de dichlorvos. La concentration de 1 mg/l correspond à la dose de traitement habituelle, il faut noter que compte tenu de la toxicité de ce type de molécule la concentration de 1 mg/l semble démesurée. La concentration de 0.1 mg/l correspond à des teneurs relevées dans l'environnement direct de stations aquacoles après traitement, dilution et dégradation du produit. Les animaux sont exposés pendant six heures aux deux concentrations puis le renouvellement en eau de mer non contaminée est assuré. Le bac C est le bac témoin sans dichlorvos et les mollusques de ce bac constituent le 100% activité AChE.

La température et la salinité de l'eau de mer sont respectivement de 15 ± 0.5 °C et 33,5 ‰.

Des prélèvements sont opérés pendant et après le traitement à 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24 et 48 heures. Six individus sont prélevés et remplacés par des animaux sains afin de maintenir le même volume de filtration. Les animaux sont immédiatement congelés à -20°C. Au laboratoire les branchies de l'huître sont prélevées et broyées ainsi que les palourdes entières dans du 0.1 M Tris pH 7.8 puis le broyat est centrifugé à 10 000g pendant 20 minutes. Le surnageant constitue la source enzymatique de cholinestérases.

L'activité AChE est mesurée selon la méthode d'Ellman décrite au paragraphe 1-3-1-2. Toutes les mesures sont quadruplées.

3-6-2. Résultats et discussion

Le comportement des bivalves a été modifié par la présence du dichlorvos aux deux concentrations. Après deux heures d'exposition tous les animaux sont ouverts à cause de la relaxation du muscle adducteur qui stoppe à la fin du traitement pour les animaux exposés à 0.1 mg/l et seulement 12 heures après pour les animaux contaminés par 1 mg/l. Aucune mortalité n'est relevée durant le traitement.

Mesures d'activité des cholinestérases de branchies chez l'huître (fig42).

Chez le lot témoin l'activité AChE reste stable à 85.8 ± 4.2 nmoles/mn/mg P. Les animaux soumis à 1 mg/l de dichlorvos montrent une inhibition rapide et importante de l'activité AChE qui atteint 87% d'inhibition après 4 heures (t=4). La reprise de l'activité débute à la fin de l'exposition mais stagne pour le reste de

l'expérimentation à un niveau très faible. L'inhibition à $t=48$ est encore de 68% par rapport à l'activité à $t=0$.

L'activité des animaux exposés à 0.1 mg/l est aussi fortement et rapidement perturbée et l'inhibition est maximale à $t=6$ avec 83% d'inhibition. En fin d'expérience l'inhibition est encore de 45%.

Aux deux concentrations testées l'inhibition est importante et le taux d'inhibition entre les animaux exposés à 0.1 mg/ et ceux exposés à 1 mg/l n'est pas significativement différent, seule la cinétique d'inhibition est légèrement plus lente à 0.1 mg/l. La récupération de l'activité AChE est faible et partielle à 48 heures.

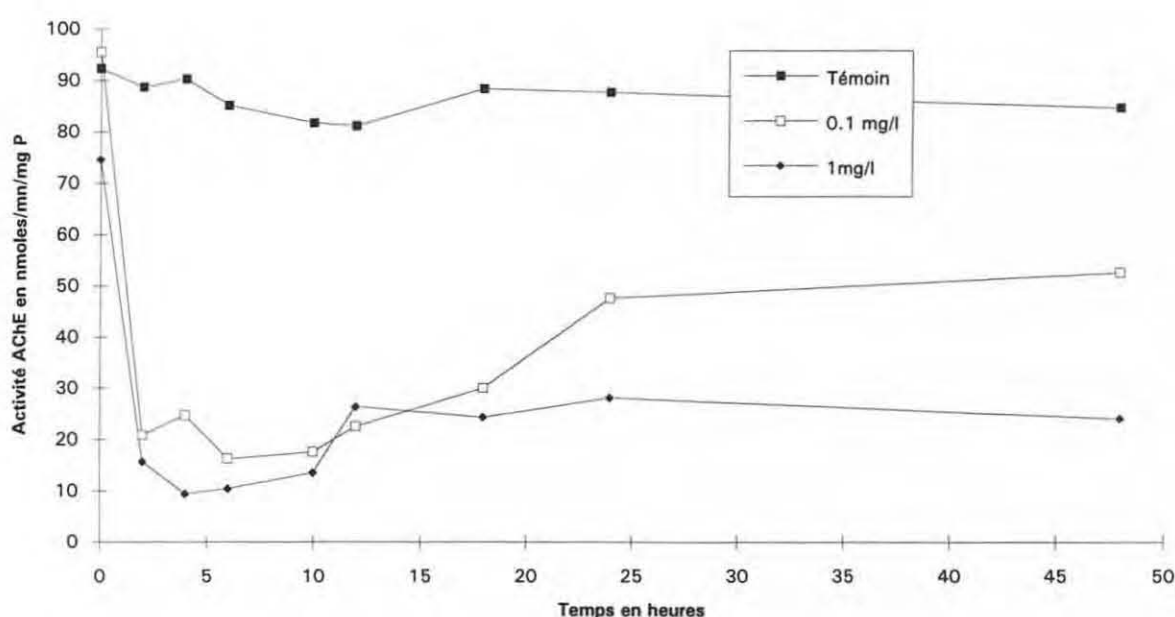


Figure 42: Effets de traitements à 0.1 mg/l et 1 mg/l de dichlorvos pendant 6 heures sur l'activité AChE de branchies d'huitre

Mesure d'activité AChE chez la palourde entière (figure 43)

L'activité AChE du lot témoin n'a cessé de décroître tout au long des deux jours et la seule explication à ce constat est qu'il y a probablement eu contamination du bac témoin par de l'eau d'un autre bac ou plus sûrement par transfert atmosphérique. Les bacs sont en effet oxygénés par de puissants aérateurs susceptibles de former un aérosol se redéposant dans le bac voisin.

Bien que l'activité AChE de la palourde entière est bien inférieure à l'activité mesurée dans la branchie d'huitre, on note néanmoins une baisse d'activité plus lente que chez l'huitre qui atteint son maximum à $t=10$ pour une exposition à 1

mg/l. A t=48, l'inhibition est plus faible et représente 27% par rapport à l'activité originale.

Chez les coquillages exposés à 0.1 mg/l, l'activité AChE décroît plus lentement; L'inhibition est la plus forte à t=8 (42%) mais la récupération est plus élevée.

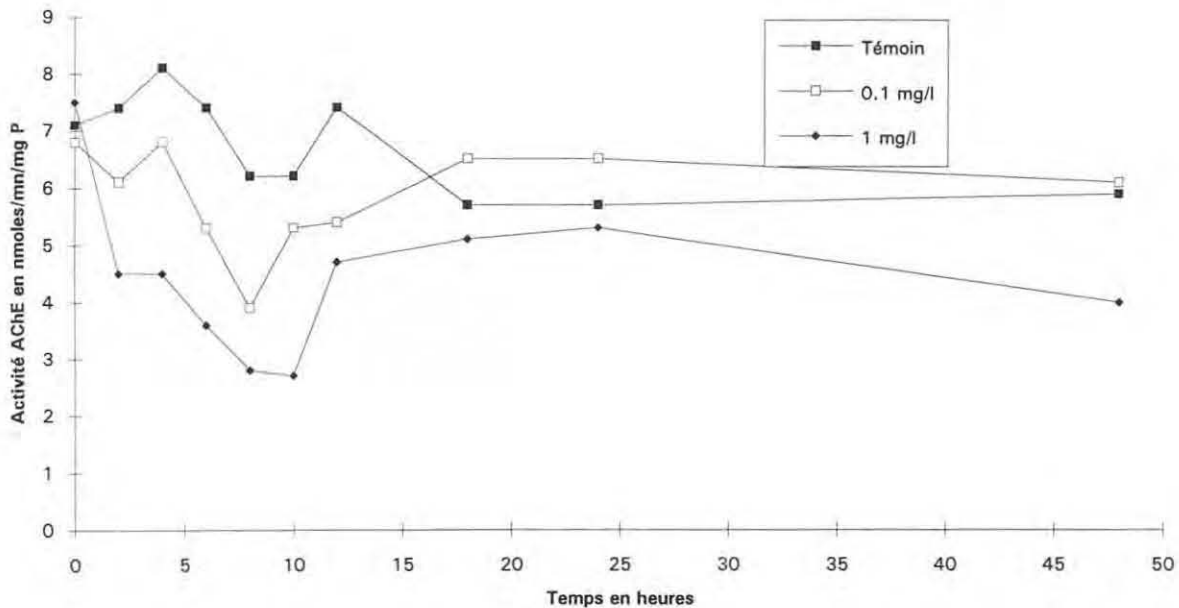


Figure 43 : Effets de traitements à 0.1 mg/l et 1 mg/l de dichlorvos pendant 6 heures sur l'activité AChE de palourde

La concentration la plus forte en dichlorvos testée (1mg/l) n'induit pas de mortalité chez l'huitre et la palourde mais seulement une relaxation des muscles adducteurs. Un tel effet a déjà été noté chez le clam (*Ruditapes decussatus*) et chez la bernique (*Patella vulgata*) par Thain et al. (1990). Peu d'informations sont disponibles sur les effets des OPs sur les coquillages, on sait seulement que ceux ci montrent des activités cholinestérasiques très faibles comparées aux mêmes activités dans le cerveau et le muscle de poisson ou même dans le muscle abdominal de crustacé (Bocquené et al., 1990). La sensibilité des mollusques aux organophosphorés et aux carbamates est aussi relativement faible et est attribuée pour partie à la présence d'une forme de cholinestérase résistante particulièrement chez l'huitre.

Les effets du traitement sont néanmoins importants et atteignent 87% chez l'huitre sans induire de mortalité. Il semble effectivement que l'effet létal apparait

tardivement dans l'évolution de l'inhibition et que la mortalité n'est pas liée qu'à l'inhibition des cholinestérases. Gibson et al.(1969) et Weiss (1965) rapportent la survie d'animaux avec une activité AChE résiduelle de 10% à 20% de l'activité initiale tandis que Coppage et Matthew (1974) et Szeto et al.(1985) constatent des mortalités chez des animaux montrant des taux d'inhibition faible.

Les effets des organophosphorés et des carbamates sont plus forts chez les crustacés que chez les mollusques. Egidius et Moster (1987) constatent la mortalité totale de homards (*Homarus gammarus*) et la survie du crabe dormeur (*Cancer pagurus*) après 6 heures d'exposition à 1 mg/l de dichlorvos. Il faut noter que la concentration d'utilisation du dichlorvos conseillée par le fabricant est de 300g/m³ soit 300 mg/l. Bocquené et Galgani (1991) notent une inhibition de l'AChE de 30% chez des crevettes roses (*Palaemon serratus*) exposées à seulement 0.1µg/l de phosalone pendant 30 jours. Thain et al. (1990) rapportent des CL₅₀ (140h) de 2.2 µg/l de dichlorvos sur la crevette grise (*Crangon crangon*) mais pas d'effets léthaux sur la moule (*Mytilus edulis*) à 1 mg/l. La sensibilité des crustacés est plus forte de l'ordre d'un facteur mille comparée à celle des bivalves.

On peut justement s'inquiéter des effets de rejets des eaux de traitements en mer et dans les marais sur les populations de larves de crustacés.

Bien qu'aucune mortalité n'ait été observée chez l'huitre et la palourde on note cependant des effets importants sur une activité physiologique essentielle.

PUBLICATION 5 :

Laboratory study on the effect of dichlorvos on two commercial bivalves

Sous presse pour Aquaculture

**Laboratory study on the effect of dichlorvos on two commercial
bivalves**

Hervé Le Bris⁽¹⁾, Patricia Maffart⁽¹⁾, Gilles Bocquené⁽²⁾, Vincent Buchet⁽³⁾,
François Galgani⁽²⁾ et Guillaume Blanc (1)

(1) Service d'Aquaculture et Pathologie Aquacole, Ecole nationale
Vétérinaire de NANTES, CP 3013, 44087 NANTES CEDEX 03, France.

(2) Laboratoire d'Ecotoxicologie, IFREMER, Centre de Nantes, rue de l'Île
d'Yeu, BP 1049, 44037 NANTES CEDEX 01, France.

(3) IFREMER, Station Aqualive, BP 59, 85330 NOIRMOUTIER en L'ÎLE,
France.

Abstract

Organophosphorus compounds (metrifonate, dichlorvos) are commonly used in marine fish farms to control ectoparasitic copepods or monogeneans populations. After fish treatment, these products may be discharged directly in shellfish areas. Since they are known for their environmental toxicity, it becomes necessary to study the effect of these chemicals on the bivalves. Two commercial bivalves : Manila clam, (Ruditapes decussatus) and Japanese oyster (Crassostrea gigas) have been exposed for 6 hours to 1 and 0.1 mg/l dichlorvos concentrations and then replaced in drug-free seawater until the end of the experiment (48h). The behaviour and mortality of the shellfish have been observed. The specific acetylcholinesterase activity (AChE) was measured in the total clam tissue and the oyster gills following the automated method of Galgani and Bocquené (1989). No abnormal mortality was observed, but all bivalves were opened because of a relaxation of the adductor muscles. AChE inhibitions were 40-70 % for clams and 83-87 % for oysters. 42 h after the end of the exposure, the AChE activity of oyster remained low and a partial recovery of the initial activity was observed for clams. These findings illustrated that the concentrations tested are not lethal but have a clear effect on the bivalves physiology. Therefore it may be considered that because of the dilution and degradation processes dichlorvos effect is only limited to bivalves reared within or in close contact with fish farms.

Key words : Bivalve, Ruditapes philippinarum, Crassostrea gigas, Toxicity, Dichlorvos, Acetylcholinesterase.

1. Introduction

Nowadays, many marine fish-farms are being developed on the French Atlantic coastline. The intensive rearing conditions lead to the use of many chemicals and veterinary products to treat or prevent diseases in fish. Among them, organophosphorus compounds, such as metrifonate and dichlorvos, are commonly used to fight skin and gill parasitoses, through deep bathing of fish into treatment solutions. In aqueous solution, metrifonate is gradually transformed into dichlorvos (Samuelsen 1987a ; Salte et al., 1987) which is more toxic than metrifonate. These chemicals are known to inhibit the acetylcholinesterase (AChE) activity of animals. Therefore, the measure of this inhibition is frequently used to detect the biological effects of organophosphorus compounds on fish or aquatic environments (Salte et al., 1987 ; Morgan et al., 1988 ; Galgani and Bocquené, 1989 ; Horsberg et al., 1989). These drugs when discharged can contaminate bivalve culture areas situated nearby. Considering their toxicity upon invertebrates (Tully and Morrissey, 1984 ; Egidius and Moster, 1987 ; Cusack and Johnson, 1990), their increasing use due to an intensification of the fish production and the recent development of fish and shellfish polyculture, it becomes necessary to know if this kind of therapeutant could be a threat for bivalves cultures.

Therefore, the aim of this study was to assess in a laboratory experiment the effect of dichlorvos upon two commercial bivalves : Manila clam (Ruditapes philippinarum) and Japanese oyster (Crassostrea gigas) by observation of their behaviour and mortality, and by measurements of their AChE activity during and after an exposure to two dichlorvos solutions. This effect has been studied for the longest exposure time theoretically

encountered by cultured bivalves and at the highest dichlorvos concentrations estimated respectively within the fish farm and inside the shellfish area.

2. Material and Methods

The experiment was carried out at the IFREMER Laboratory of Noirmoutier (France). Japanese oysters ($78\pm 5\text{g}$) and Manila clams ($25\pm 1\text{g}$) came from shellfish culture areas uncontaminated by fish farm effluents. Sixty four individuals of each species were placed in three 2m^3 tanks (A, B, C) filled with seawater. Seawater circulation was stopped before dichlorvos was added in tanks A and B, to reach respective concentration of 1 mg/l and 0.1 mg/l . The 1 mg/l concentration corresponded to the usual fish treatment dose and the maximum dichlorvos concentration discharge. The 0.1 mg/l concentration corresponded to the maximum concentration reached in the shellfish area from the discharge according to dilution and degradation processes. After six hours of dichlorvos exposure, maximum time exposure corresponding to a tide length, the bivalves were replaced into tanks filled with clean seawater (A1, B1). A control tank (C) received no dichlorvos. Temperature and salinity were respectively $15.5\pm 0.5\text{ }^\circ\text{C}$ and 33.5 ‰ .

Sampling was done at times 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24 and 48 hours, after the beginning of treatment. At each sampling time, 8 individuals of each species were removed from the tank and replaced by 8 individuals taken from an uncontaminated storage tank in order to maintain the same volume filtered. Samples were stored at -20°C until analysed. In the

laboratory, the samples were thawed. Total tissues of clams and gills of oysters were then suspended in a TRIS 0.1 M, pH 7.8 buffer, crushed with an Ultra-turrax (30 s), homogeneized and then centrifugated (20 min, 10000 g, 10°C). The supernatant constituted the enzyme extract. The enzyme activity was measured according to the automated method of Galgani et Bocquéné (1989). Quantitative determination of protein was determined according to the Bradford method. The specific AChE activity of each sample was calculated according the formula :

$$As = Ab / (Q \times P \cdot 10^{-3})$$

As = specific activity

Ab = gross activity

Q = Quantity of the extract used for determination of the gross activity

P = Protein concentration of the extract

"As" is expressed in U/mg protein, were the unit of AChE activity (U) is the variation of 0.001 optical density per minute.

All assays were completed in quadruplicate.

3. Results

Animal behaviour and mortality

Before contamination, the number of opened and closed bivalves was approximately equal. After two hours of 0.1 or 1 mg/l exposure, all the bivalves were notably opened corresponding to a relaxation of the adductor muscles. This phenomenon stopped at the end of exposure for the bivalves exposed to a 0.1 mg/l concentration. It continued during 12 hours for bivalves exposed to 1 mg/l.

No mortality was observed in the control and treated tanks during the experimentation.

Acetylcholinesterase activity variations in oyster gills

Low variation of the AChE activity was observed in control oysters (Fig. 1). The level varied between 1100 and 1250 U/mg protein.

At 1 mg/l dichlorvos concentration, a rapid decrease was observed. The activity was minimal at t=4 hours (87 % inhibition). The inhibition percentage was still 68 % at the end of the experiment. At 0.1 mg/l dichlorvos exposure, a clear and rapid decrease was also noticed. Minimum activity was reached at t=6 hours (83 %). The inhibition percentage measured at 48 h was 45 %. Therefore, at the both concentrations, the recovery of the normal activity was not observed at the end of the experiment.

Acetylcholinesterase activity variations of clam tissues

The AChE activity of the control varied between 78 to 107 U/mg protein) and showed a decrease during the 2-days experiment (Fig. 2). One must noted the lower AChE activity of clam tissues compared to oyster gills.

At 1mg/l dichlorvos concentration, the AChE activity decrease was slower than in oyster gills since minimum was observed 10 hours after the beginning of dichlorvos exposure (64 % inhibition). The inhibition observed at 48 hours was 27%.

At 0.1 mg/l dichlorvos exposure, the AChE activity also slowly decreased. Minimum AChE activity was reached 8 hours after the beginning of the exposure (42 % inhibition). At the end of the experiment, the AChE activity of the bivalves situated within the control tank was still above those of bivalves exposed to 1 and 0.1 mg/l dichlorvos concentrations.

4. Discussion

The doses of dichlorvos used in this experiment have induced no mortality but a relaxation of the adductor muscles. Such relaxation has also been observed in the european clam (Ruditapes decussatus) or in the foot of the gastropod Patella vulgata (Thain et al., 1990). This relaxation was more persistent in clams than in oysters.

Although the effects of organophosphorus on the AChE activity of fish are known, little information is available about shellfish. This experiment showed that the normal AChE activity was 10 times less in clam tissue than in oyster gills, and that response to dichlorvos exposure was quicker in oyster. Bocquené et al. (1990) have shown that AChE activity was higher in total oyster tissue than in total clam tissue. This difference might be due to a lower metabolism in clams compared to oysters as suggested by Mattson et al. (1988) regarding differences observed between mussels (Mytilus edulis) and European oysters (Ostrea edulis). The normal bivalve activity tested here is far below normal activity in fish brain or muscles, or in crustaceans.

This study demonstrated a clear effect of dichlorvos upon the AChE activity of the tested species at usual and ten times-less fish therapeutic concentrations, since maximal inhibition was respectively 64 % and 42 % for clams and 87 % and 83 % for oysters. Although inhibition values measured here are more often higher than the level of 50 % generally considered as indicative of a life-threatening situation (Day and Scott, 1990), no mortality has been observed. The good physiological conditions of the bivalves tested could explain the lack of mortality. The release into clean seawater always permitted a quicker increase of the AChE activity in clams than in oysters.

The effects of dichlorvos on crustaceans are greater than on molluscs (Egidius and Moster, 1987 ; Bocquené et al., 1990 ; McHenery et al., 1991). Thus, adult mussels are considered as little sensitive to the organophosphorus effect (Cusack and Johnson, 1990) and as bad indicators of organophosphorus pollution (Galgani and Bocquené, 1990). However, Thain et al. (1990), have demonstrated that for 49 days of exposure, growth of Japanese oysters and European clams was affected by concentrations of respectively 0.03 and 0.33 mg/l. Even for 6 hours exposure at 0.1 mg/l dichlorvos concentration, this study showed clear effect on a physiological function. Therefore, we can consider that the decrease of the AChE activity indicated an early effect caused by dichlorvos and may lead to repercussions on other function like growth. These results should lead to further investigations on the relation between the physiological conditions of the bivalve and i) the AChE inhibition caused by dichlorvos and ii) the time of recovery of the normal AChE activity after a dichlorvos exposure.

Persistence of dichlorvos in seawater is low. Its degradation process depends on pH, temperature and salinity (Samuelsen, 1987b). The lower the salinity, the shorter its half-life in seawater (Dobson and Tack, 1991). Its effects on shellfish depend on its final concentration which is related to degradation and dilution. This laboratory study suggested that because of the lack of shellfish mortality observed at the highest dichlorvos concentrations theoretically encountered by bivalves, the influence of dichlorvos is restricted to an effect on bivalve physiology as indicated by the AChE inhibitions measured. Therefore, we can consider that the real influence is only limited to aquaculture systems like those described by Jones and Iwama (1991) or Shpigel and Friedman (1990) where shellfish are reared respectively within (in the fish net pens) or in close contact with fish-farms (directly in the fish-farm effluent).

Acknowledgements

We are grateful to the members of the IFREMER Laboratory of Noirmoutier, and the Aquaculture and Ichthyopathology Laboratory of the National Veterinary School of Nantes. We also thank Prof. S. Woehrle for re-reading this manuscript.

This study was financially supported by the Syndicat Mixte pour le Développement de l'Aquaculture dans les Pays de la Loire (France).

References

- Bocquené, G., Galgani, F. and Truquet P., 1990. Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. *Marine Environmental Research*, 30 : 75-89
- Cusack, R. and Johnson, G., 1990. A study of dichlorvos (NUVAN ; 2-2 dichloroethenyl dimethylphosphate), a therapeutic agent for the treatment of salmonids infested with sea lice (Lepeophtheirus salmonis). *Aquaculture*, 90 : 101-112.
- Day, K.E. and Scott, I.M., 1990. Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides. *Aquatic toxicology*, 18 : 101-114.
- Dobson, D.P. and Tack J., 1991. Evaluation of the dispersion of treatment solutions of dichlorvos from marine salmon pen. *Aquaculture*, 95 : 15-32.
- Egidius, E. and Moster B., 1987. Effects of NEGUVON ND and NUVAN ND on crabs (Cancer pagurus, Carcinus maenas), lobsters (Homarus gammarus) and blue mussel (Mytilus edulis). *Aquaculture*, 60 : 165-168.
- Galgani, F. and Bocquené, G., 1989. A method for routine detection of organophosphates and carbamates in sea-water. *Environmental Technology Letters*, 10 : 311-322.

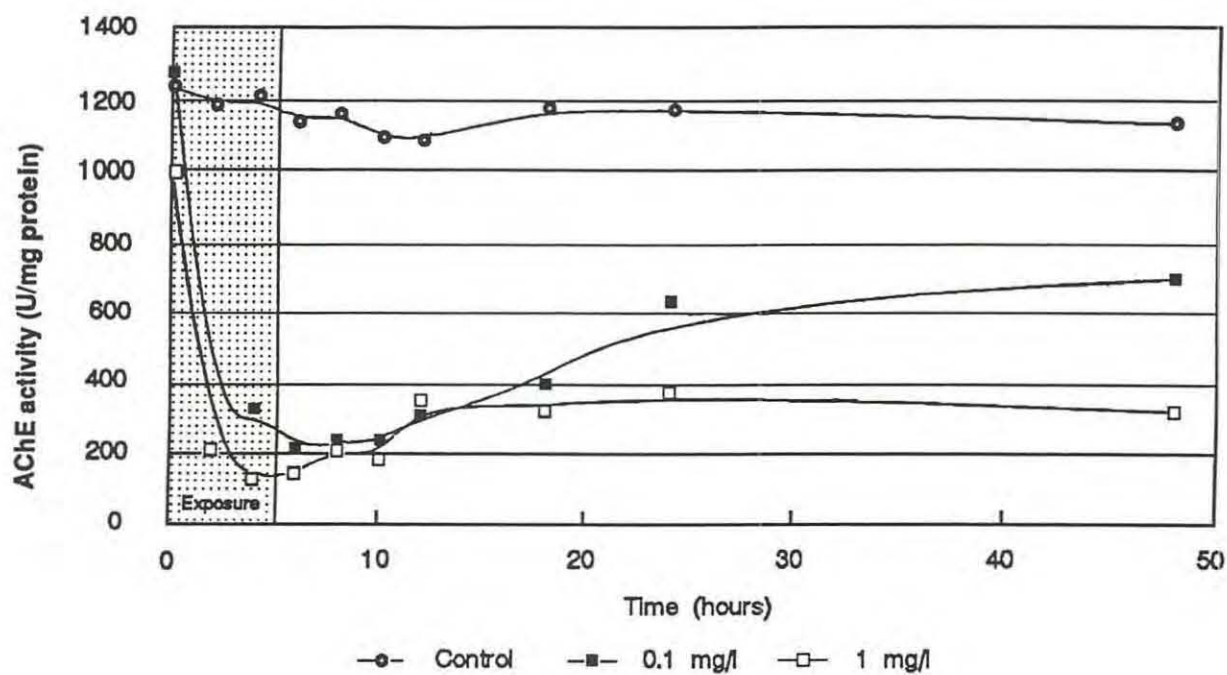
- Galgani, F. and Bocquené G., 1990. In vitro inhibition of acetylcholinesterase from four marine species by organophosphates and carbamates. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 45 : 243-249.
- Horsberg, T. E., Høy, T and Nafsad I., 1989. Organophosphate poisoning of atlantic salmon in connection with treatment against salmon lice. Acta vet. scand., 30 : 385-390.
- Jones, T.O. and Iwama G.K., 1991. Polyculture of the Pacific oyster, Crassostrea gigas (Thunberg), with chinook salmon, Oncorhynchus tshawytscha
- Mattson, N.S., Egidius, E. and Solbakken, J.E., 1988. Uptake and elimination of (Methyl¹⁴C) Trichlorfon in Blue Mussel (Mytilus edulis) and European Oyster (Ostrea edulis) - Impact of Neguvon^R on mollusc farming. Aquaculture, 71 : 9-14.
- McHenery, J.G., Seward, D. and Seaton, D.D., 1991. Lethal and sub-lethal effects of the salmon delousing agent dichlorvos on the larvae of the lobster (Homarus gammarus L.) and herring (Clupea harengus L.). Aquaculture, 98 : 331-347.
- Morgan, M.J., Fancey, L.L. and Kiceniuk, J.W., 1990. Response and recovery of brain acetylcholinesterase activity in atlantic salmon (Salmo salar) exposed to fenitrothion. Canadian Journal of Fish and Aquatic Science, 47 : 1652-1654.

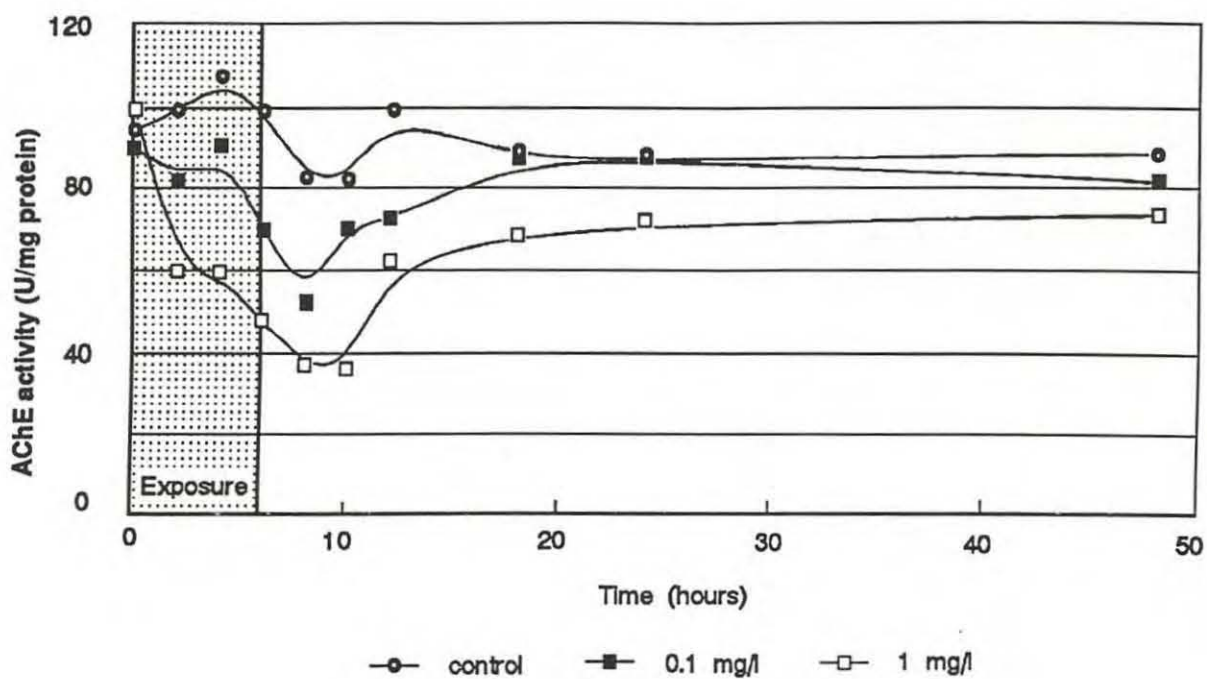
- Salte, R., Syversten, C. et Kjonnoy M., 1987. Fatal acetylcholinesterase in salmonids subjected to a routine organophosphate treatment. *Aquaculture*, 61 : 173-179.
- Samuelsen O.B., 1987a. Degradation of trichlorfon to dichlorvos in sea water : a preliminary report. *Aquaculture*, 60 : 161-164.
- Samuelsen O.B., 1987b, Aeration rate, pH and temperature effects on the degradation of trichlorfon to DDVP and the half lives of trichlorfon and DDVP in sea water. *Aquaculture*, 66 : 373-380.
- Shpigel, M. and Fridman, R., 1990. Propagation of the Manila clam (*Tapes semidecussatus*) in the effluent of fish aquaculture ponds in Eilat, Israel. *Aquaculture*, 90 : 113-122.
- Thain, J. E., Matthiessen, P. and Bifield, S., 1990. The toxicity of dichlorvos to some marine organisms. *ICES Marin. Env. Com. CM 1990, E, 18, 15 pages.*
- Tully, O. and Morissey, D., 1984. Concentrations of dichlorvos in Beitreach Bui Bay, Ireland. *Marine Pollution Bulletin*, 20 (4) : 190-191.

Legends of figure

Figure 1. AChE activity of the oyster gills

Figure 2. AChE activity of the clams





CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Signification écotoxicologique de l'inhibition de l'AChE

Pour qu'un indice tel que la variation d'activité des cholinestérases ait une signification écotoxicologique, il faut prioritairement distinguer une inhibition d'une variation naturelle. Le milieu biologique présentant la complexité qu'on lui connaît, la réponse est à la mesure de cette complexité. Néanmoins en procédant par ordre, on peut appréhender les causes reconnues de variabilité naturelle d'une fonction biologique telle que l'activité cholinestérasique. Si celle-ci n'est pas directement liée à l'âge, au sexe ou à la période de reproduction chez la grande majorité des organismes adultes, certains stades post-larvaires ou juvéniles montrent des activités plus fortes qu'il convient de contrôler. Parmi les paramètres environnementaux influents, une attention constante doit être portée à la température du milieu ainsi qu'à celle de la mesure de l'activité. Sur le terrain les échantillons seront obtenus de manière synchrone sur une période de temps n'excédant pas quelques jours et dans des conditions climatiques comparables. Seules ces contraintes peuvent garantir une signification aux mesures des cholinestérases.

L'acétylcholinestérase est utilisée ici comme biomarqueur des effets spécifiques des neurotoxiques issus principalement de la contamination du milieu marin littoral. Des corrélations claires sont mises en évidence entre les niveaux d'activité des cholinestérases et l'amplitude de la contamination du milieu.

Cette utilisation des cholinestérases est due à leur très forte sensibilité aux inhibiteurs et plus particulièrement aux insecticides de type organophosphorés (OP) et carbamates. Les données relatives aux seuils d'induction d'effets inhibiteurs liés à ces molécules mettent en évidence des effets à partir d'une exposition à des concentrations de l'ordre du microgramme par litre. Dans l'état actuel de nos connaissances sur les niveaux de présence de ces molécules dans les différents compartiments marins, il n'est pas possible d'attribuer aux seuls organophosphates et carbamates les effets observés. Les données chimiques sur ces produits en milieu marin sont inexistantes et les organismes marins plus encore que les organismes terrestres sont soumis en permanence aux effets de mélanges complexes de contaminant. D'autre part les interactions entre les contaminants sont extrêmement difficiles à appréhender. Bien que les formulations insecticides contiennent souvent plusieurs molécules inhibitrices, les données relatives à l'addition des effets de ces substances sont rares. L'étude

des effets inhibiteurs de mélanges, deux par deux, de cinq de ces molécules montre que dans tous les cas étudiés les effets inhibiteurs cumulés sont de type synergique, c'est-à-dire que l'effet inhibiteur global est plus grand que celui attendu de l'addition des effets de chaque composé.

La synergie la plus forte est observée dans les mélanges impliquant un organophosphoré et un carbamate (OP+C). La synergie est moins forte dans les cas de mélanges de molécules de même type (OP+OP/C+C). L'intensité de l'effet synergique est directement lié à la durée de l'incubation entre l'enzyme et le mélange d'inhibiteurs. Mais d'autres molécules sont responsables d'effets inhibiteurs *in vitro* et parmi les composés inorganiques, les ions arsenite et arsenate, le chlorure mercurique et le chlorure de cuivre montrent des effets inhibiteurs. Les chlorures de zinc et de cadmium ainsi que l'arsenic peuvent augmenter les effets inhibiteurs de certains OP et C. Bien d'autres molécules au pouvoir inhibiteur et pour l'instant insoupçonnées dans le milieu marin peuvent avoir leur part de responsabilité dans l'effet observé. Certaines toxines phytoplanctoniques sont connues pour exercer des effets inhibiteurs, ces anatoxines sont essentiellement produites par des efflorescences de cyanobactéries qui sont limitées aux eaux douces mais peut on imaginer la diffusion de ces toxines dans un milieu estuarien ?

Peu de données sont disponibles sur les niveaux de contamination par les OP et C dans les différents compartiment marins. L'acquisition de ces données notamment dans la matière vivante paraît essentielle à l'éventuelle relation entre la variation dans l'activité AChE et la contamination par ces insecticides.

L'utilisation des cholinestérases en monitoring a été aussi développée sous forme de biocapteurs où l'enzyme est immobilisée sur une membrane ou bien en détection d'effets inhibiteurs *in vitro* et l'AChE en solution est incubée avec d'éventuels inhibiteurs recherchés.

De nombreux points restent à élucider:

- La distribution des différentes formes de cholinestérases est-elle homogène et stable dans un même organisme sur un cycle annuel ?
- Quelles sont les possibilités de démontrer qu'il s'agit effectivement d'une inhibition quand des niveaux d'activité différents sont constatés ? L'utilisation de réactivateurs tels que les oximes ou la quantification des cholinestérases à l'aide d'anticorps peut-elle apporter des éléments de compréhension ?

- Quelle est la cinétique de contamination d'un organisme par les neurotoxiques ? Quels sont les organes les plus atteints, où les effets sont-ils les plus rémanents ? Quelle peut-être la cinétique de décontamination en terme de durée ? Comment et sur quelle durée se fait le retour à des activités normales ?
- Quels sont les mécanismes de réparation mis en place par l'organisme exposé et en quoi interfèrent-ils avec la réponse mesurée compte tenu notamment du renouvellement rapide de l'enzyme ?

Perspectives

Trois axes de recherche sont essentiels au développement de l'acétylcholinestérase en tant que marqueur des effets des insecticides organophosphorés et des carbamates.

- *Niveaux de présence des OPs et Cs dans le milieu marin*

La corrélation entre les effets observés sur les organismes et des concentrations en OP et C mesurées dans leur biotope ne peut vérifiée que par le développement de l'analyse chimique de ces composés. Mais le seuil de détection de ces molécules est assez élevé et quelques fois proche du seuil de toxicité. En théorie, la limite de détermination analytique en spectrographie de masse ou en chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur azote/phosphore se situe aux alentours de 100 pg dans des conditions de laboratoire (l'organophosphoré ou le carbamate sont introduit dans le solvant d'extraction). En réalité, les seuils de détection à partir de prélèvements dans le milieu sont nettement plus élevés puisque compris entre 0.05 µg/l et 0.10 µg/l et devraient tenir compte du rendement d'extraction . L'absence relative de données sur ces contaminants est liée à leur coût élevé d'une part et d'autre part aux priorités données dans les années 80 à la détection de contaminants plus rémanents tels que les organochlorés ou les triazines.

- *Sélection de cholinestérases naturelles hypersensibles*

Chez l'huitre comme chez de nombreux autres organismes, l'acétylcholinestérase montre un important polymorphisme sur le plan moléculaire avec d'importantes répercussions sur le plan cinétique, ainsi la sensibilité de la forme membranaire au paraoxon atteint 40 000 fois celle de sa congénère soluble. L'existence de formes moléculaires présentant des propriétés pharmacologiques distinctes est

signalée chez plusieurs nématodes mais aussi chez un poisson, *Platichthys flesus* (Steiger et al., 1989).

La connaissance approfondie du polymorphisme important de cette enzyme chez de nombreuses espèces est nécessaire (certaines AChEs et certaines espèces montrent une sensibilité plus forte d'un facteur 10 à 10 000, voire plus). Cette connaissance des formes naturelles sensibles est une étape capitale dans le développement du monitoring des effets des polluants dans le milieu marin à partir des cholinestérases.

- *Fabrication de cholinestérases hypersensibles par mutagénèse*

L'expérience de plusieurs équipes travaillant sur les cholinestérases d'insectes et le développement des outils de la biologie moléculaire (l'AChE et le gène qui la code sont connus chez beaucoup d'espèces) doivent conduire à une amplification de la réponse en terme de sensibilité et de spécificité des effets par la sélection ou la fabrication d'AChE hypersensibles par mutagénèse dirigée.

Ainsi, l'isoleucine₁₉₉ a été mutagénéisée en plusieurs acides aminés avec des chaînes latérales plus ou moins encombrantes. Les gènes ainsi mutés ont été transférés dans un système baculovirus, les protéines correspondantes ont été produites puis purifiées par chromatographie d'affinité.

Cette approche a permis de confirmer l'hypothèse de départ : plus la chaîne latérale en position 199 est courte plus l'acétylcholinestérase est résistante. A l'inverse, plus la chaîne latérale est encombrante plus l'enzyme est sensible.

En 1996, la liste des biomarqueurs potentiels d'exposition aux contaminants continue à s'allonger mais l'inhibition des cholinestérases reste une des seules techniques fiables pour démontrer des perturbations sublétales précoces. L'un des atouts majeurs des cholinestérases est d'être actuellement l'un des systèmes enzymatiques les mieux connus. Il est certain que la complémentarité entre la connaissance fondamentale de la molécule et son usage à des fins de diagnostic de l'état de l'environnement marin est indispensable à l'amélioration de cet outil, notamment pour en amplifier la sensibilité.

C'est peut-être l'opportunité de réunir dans un même projet, la préservation des océans, les deux pôles de la recherche, fondamentale et appliquée qui se sont quelques fois ignorés.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

A.C.T.A. 1993. Index phytosanitaire 1993. Association de Coordination Technique Agricole. Paris. 527p.

Appleyard M.E. 1994. Non-cholinergic functions of acetylcholinesterase Dans *Multidisciplinary Approaches to Cholinesterase Functions*. Edité par Shafferman and Velan, Plenum Press, New-York. 285-288.

Arpagaus M. et Toutant J.P. 1985. Polymorphism of acetylcholinesterase in adult *Pieris brassicae* heads. Evidence for detergent insensitive and Triton X-100 interacting forms. *Neurochem. Int.* Vol. 7, 793-804.

Arpagaus M., Fedon Y., Cousin X., Chatonnet A., Berge J.B., Fournier D. et Toutant J.P. 1994. cDNA Sequence, gene structure and *in vitro* expression of ace-1, the gene encoding acetylcholinesterase of class A in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* Vol. 269. N° 13, 9957-9965.

Arpagaus M., Richier P., Berge J.B. et Toutant J.P. 1992. Acetylcholinesterase of the nematode *Steinernema carpocapsae*. Characterization of two types of amphiphilic forms differing in their mode of membrane association. *Eur. J. Biochem.* 207, 1101-1108.

Barcelo D., Sole M., Durand G. et Albaiges J. 1991. Analysis and behaviour of organophosphorous pesticides in a rice crop field. *Fresenius. J. Anal. Chem.* 339 : 676-683.

Belzunces L.P., Toutant J.P. et Bounias M. 1988. Acetylcholinesterase from *Apis mellifera* head. Evidence for amphiphilic and hydrophilic forms characterized by Triton X-114 phase separation. *Biochem. J.* 255.463-470.

Bernard C.B. et Philogene B.J.R. 1993. Insecticides synergists: role, importance and perspectives. *J. Toxicol. Env. Health.* 38 : 199-223.

Bocquené G. et Galgani F. 1991. Acetylcholinesterase activity in the common prawn (*Palaemon serratus*) contaminated by carbaryl and phosalone. *Ecotox. Environ. Safety.* 22 : 337-345.

Bocquené G., Bellanger C., Cadiou Y. et Galgani F. 1995. Joint action of combinations of pollutants on the acetylcholinesterase activity of several marine species. *Ecotoxicology* **4**, 266-279.

Bocquené G., Galgani F. et Truquet P. 1990. Characterisation and assay conditions for the use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. *Mar. Environ. Res.* **30** : 75-89.

Bordier C. 1981. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X114 solution. *J. Biol. Chem.*, Vol. **256**, N° 4, pp. 1604-1607.

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive assay of protein utilizing the principle of dye binding. *Analyt. Biochem.*, **772** : 248-264.

Burridge L.E. et Haya K. 1988. The use of a fugacity model to assess the risk of pesticides on the aquatic environment on Prince Edward Island. *Adv. Environ. Sci. Technol.* Vol. **22** : 193-203.

Capel P.D., Giger W., Reichert P. et Wanner O. 1988. Accidental input of pesticides into the Rhine River. *Environ. Sci. Technol.*, Vol. **22**, N° 9, 992-997.

Carmichael W. 1994. Les toxines des cyanobactéries. *Pour la Science*, N°197. March 1994. (*Pour la Science* is the french issue of *Scientific American*).

Carmichael W. et Falconer I.R. 1993. Diseases related to freshwater blue-green algal toxins and control measues. Dans "*Algal toxins in seafood and drinking water*". Chapitre 12, pages 187-209. Academic Press Ltd, Londres.

Chang S. et Opperman C.H. 1991. Characterization of acetylcholinesterase molecular forms of the root-knot nematode, *Meloidogyne*. *Molecular and Biochemical Parasitology.* **49** : 205-214.

Chauvin J. 1993. La mytiliculture en Baie de Vilaine. Aspects socio-économiques. Rapport Interne DEL. IFREMER 93.02.

Chevreuil M. 1978. Evolution et transport des pesticides. Exemple du bassin versant de l'Orgeval. Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris VI.

Cooper J.F. 1992. Etude de faisabilité d'un laboratoire d'analyses de résidus de pesticides en Martinique. Faculté de Pharmacie. Montpellier. 85 p.

Coppage D.L. et Braidech T.E. 1976. River pollution by anticholinesterase agents. *Water Res.*, **10** : 19-24.

Coppage D.L. et Matthews E. 1974. Short-term effects of organophosphate insecticides on cholinesterases of estuarine fishes and pink shrimp. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* Vol II, N° 5 : 438-488.

Cossa D., Auger D., Averty B., Luçon M., Masselin P., Noel J. et Sanjuan J. 1989. Atlas des niveaux de concentrations en métaux, métalloïdes et composés organochlorés dans les produits de la pêche côtière française. IFREMER.DERO.89-10-MR.

Danischewski D., Rabe V. et Karbe L. 1994. Enzyme des Entgiftungsstoffwechsels und Acetylcholinesterase in Miesmuscheln (*Mytilus edulis*). Biologische Effekte von Schadstoffen und toxisches Potential von Wasse und Sediment in Elbe und Nordsee Berichte Aus Dem Zentrum Für Meeres und Klimaforschung. Universität Hamburg. Januar 1994.

Davies P.E. et Cook L.S.J. 1993. Catastrophic macroinvertebrate drift and sublethal effects on brown trout, *Salmo trutta* ; caused by cypermethrine spraying on a Tasmanian stream. *Aquat. Toxicol.* **27** : 201-224.

Davies P.E., Cook L.S.J. et Goenarso D. 1994. Sublethal responses to pesticides of several species of Australian freshwater fish and crustaceans and rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem.* Vol. **13**, N° 8, 1341-1354.

Day K.E. et Scott I.M. 1990. Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides. *Aquatic Toxicol.* **18** : 101-114.

Dethlefsen V. 1988. Status report on aquatic pollution problems in Europe. *Aquat Toxicol.* **11** : 259-286.

Deutsches Hydrographisches Institut 1988. Jahresbericht 1987. Universität Hamburg. 58-59.

Durand G. et Barcelo D. 1992. Environmental degradation of atrazine, linuron and fenitrothion in soil samples. *Toxicol. Environ. Chem.* Vol. **36**, 225-234.

Eggens M., Galgani F., Klungsør J. et Everts J. 1992. Hepatic EROD activity in dab *Limanda limanda* in the German Bight using an improved plate-reader method. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. **91**:71-75.

Egidius E. et Møster B. 1987. Effects of Neguvon and Nuvan treatment on crabs (*Cancer pagurus*, *Cancer maenas*), lobster (*Homarus gammarus*) and blue mussel (*Mytilus edulis*). *Aquaculture*, **60**:165-168.

Ellman G.L., Courtney K.O., Andrres V. et Featherstone R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7** : 88-95.

Eto M. 1974. Organophosphorus pesticides:organic and biological chemistry. CRC Press. Cleveland, Ohio. 387 p.

Fikes J.D. 1990. Organophosphorous and carbamate insecticides. *Veterinary Clinics of North America : small animal practice.* Vol. **20**, N° 2, 353-367.

Fournier D., Cuany A., Bride J.M. et Bergé J.B. 1987. Molecular polymorphism of head acetylcholinesterase from adult houseflies (*Musca domestica* L.). *J. Neurochem.*, Vol. **49**, N° 5, 1455-1461.

Fournier D., Bride J.M., Karch F. et Berge J.B. 1988a. Acetylcholinesterase from *Drosophila melanogaster*, identification of two subunits encoded by the same gene. *FEBS lett.* **238**, 333-337.

Fournier D., Berge J.B., Cardoso De Almeida M.L. et Bordier C. 1988b. Acetylcholinesterase from *Musca domestica* and *Drosophila melanogaster* brain are linked to membranes by a glycopospholipid anchor sensitive to an endogenous phospholipase. *J. Neurochem.*, Vol. **50**, N° 4, 1158-1163.

Fournier D., Karch F., Bride J.M., Hall L.M.C., Bergé J.B. et Spierer P. 1989. *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase gene : structure, evolution and mutations. *J. Mol. Biol.*, **210**, 15-22.

- Fournier D. et Mutero A.** 1994. Mini review. Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol; 108C, N° 1,19-31.
- Franck R., Braun H.E., Chapman N. et Burchat C.** 1991. Degradation of parent compounds of nine organophosphorous insecticides in Ontario surface and ground waters under controlled conditions. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **47** : 374-380.
- Fukuto T.R.** 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ. Health.Perspect.* Vol.**87**.245-254.
- Futerman A.H., Low M.G., Ackerman K.E., Sherman W.R. et Silman I.** 1985. Identification of a covalently bound inositol in the hydrophobic membrane domain of Torpedo acetylcholinestérase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **129** : 312-317.
- Gaddum J.H.** 1948. Pharmacology, 3rd ed., Oxford University. Press, London.
- Galgani F. et Bocquené G.** 1988 A method for routine detection of organophosphorous and carbamates in sea water. *Environ. Technology Letters.* Vol. **10** : 311-322.
- Galgani F. et Bocquené G.** 1990. *In vitro* inhibition of acetylcholinesterase from four marine species by organophosphates and carbamates. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **45** : 243-249.
- Galgani F., Bocquené G. et Cadiou Y.** 1992a. Evidence of variation in cholinesterase activity in fish along a pollution gradient in the North Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. **91**, No 1 to 3 : 77-82.
- Galgani F., Cadiou Y. et Gilbert F.** 1992b. Simultaneous and iterative weighted regression analysis of toxicity tests using a microplate reader. *Ecotox. Environ. Safety.* **23** : 237-243.
- Ghosh T.K.** 1990. Synthetic pyrethroid intoxication on tissue acetylcholine and acetylcholinesterase in the fish *Tilapia mossambica*. *Environ. Ecol.* Vol. **8**, n° 3, 950-954.

Giam C.S et Ray L.E. 1987. Pollutant studies in marine animals. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.

Gibson J.R., Ludke J.L. et Ferguson D.E. 1969. Source of error in the use of fish brain acetylcholinesterase activity as a monitor for pollution. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* Vol 4, N°1:17-23.

Gill T.S., Tewari H. et Pande J. 1991. *In vivo* and *in vitro* effects of cadmium on selected enzymes in different organs of the fish *Barbus conchoniuis*. *Comp. Biochem. Physiol. C.* Vol. 100 C, N° 3, 501-505.

Gillet H. 1992. Les pesticides dans les eaux superficielles. Situation régionale. Identification et quantification des pesticides dans les eaux naturelles. Séminaire du 19.11.1991. Orléans. Agence de l'eau Loire-Bretagne.

Gillet H. 1994. Etude de la contamination des eaux superficielles de Bretagne par les pesticides. Résultats du suivi de 1993. Préfecture de la Région Bretagne. Service Régional de la Protection des Végétaux. Rennes.

Greenfield S.A. 1991. A non cholinergic action of acetylcholinesterase AChE in the brain: from neuronal secretion to the generation of movement. *Cell. Mol. Neurobiol.* 11 : 55-78.

Gupta R.C. 1994. Carbofuran toxicity. *J. Toxicol. Env. Health.* 43 : 383-418.

Habig C., Di Giulio R.T. et Abou-Donia M.B. 1988. Comparative properties of Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and Blue crab (*Callinectes sapidus*) acetylcholinesterases. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 91 C No 2 : 293-300.

Habig C., Di Giulio R.T., Nomeir A.A. et Abou-Donia M.B. 1986. Comparative toxicity, cholinergic effects and tissue levels of S,S,S,-Tri-n-Butyl Phosphorotrithioate (DEF) to Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and Blue crab (*Callinectes sapidus*). *Aquatic Toxicol.* 9 : 193-206.

Habig C. et Di Giulio R.T. 1988. The anticholinesterase effect of the cotton defoliant S,S,S,-Tri-n-Butyl Phosphorotrithioate (DEF) on Channel catfish. *Marine Environ. Res.* 24 : 193-197.

- Hogan J.W.** 1970. Water temperature as a source of variation in the specific activity of brain cholinesterase of bluegills. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **5**, 347-354.
- Holland H.T., Coppage D.L. et Butler P.A.** 1967. Use of fish brain acetylcholinesterase to monitor pollution by organophosphorous pesticides. *Bull. Environ. Contam. and Toxicol.* Vol. **2**, N° 3, 156-162.
- Horsberg T.E., Hoey T. et Nafstad I.** 1989. Organophosphate poisoning of Atlantic salmon in connection with treatment against salmon lice. *Acta Vet. Scand.* Vol. **30**, N° 4 : 385-390.
- Høy T., Horsberg T.E. et Wichstrøm R.** 1991. Inhibition of acetylcholinesterase in rainbow trout following dichlorvos treatment at different water oxygen levels. *Aquaculture*, **95** : 33-40.
- Hucho F., Järv J. et Weise C.** 1991. Substrates binding sites in acetylcholinesterase. *Trends In Pharmacological Sciences.* Vol. **12** : 422-426.
- ICES/IOC** 1978. Cooperative research report N° 75. On the feasibility of effects monitoring. Charlottenhund, DENMARK.
- ICES/IOC** 1990. Workshop on the Biological Effects of Contaminants in the North Sea. Bremerhaven. GERMANY. ICES Copenhagen.
- Karnovski M.J et Roots L.** 1964. A direct coloring thiocholine method from cholinesterases. *J. Histochem. Cytochem.* Vol. **12**, N° 0 : 219-222.
- Kempf M.** 1988. Projet de campagne Antiquail. Compte rendu de mission aux Antilles . Rapport IFREMER DRO.EL-89.07.Brest.16 p.
- Klaverkamp J.F. et Hobden B.R.** 1980. Brain acetylcholinesterase inhibition and hepatic activation of acephate and fenitrothion in rainbow trout (*Salmo gardeneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* Vol. **37** : 1450-1453.
- Koelle G.B.** 1994. Pharmacology of organophosphates. *J. Appl. Toxicol.* Vol. **14** (2), 105-109.

- Kobayashi K, Nakamura Y, Rompas R.M. et Imada N.** 1986. Difference in lethal concentration *in vivo* between fenitrothion and its oxoform in tiger schrimp *Penaeus japonicus*. *Bull. Japan. Soc. Sci.Fisheries*. N° 52.(2) : 287-292.
- Kreimer D.I., Dolginova E.A., Raves M., Sussman J.L., Silman I. et Weiner L.** 1994. A metastable state of *Torpedo californica* acetylcholinesterase generated by modification with organomercurials. *Biochemistry*. 33:14407-14418.
- Lacorte S., Lartigues S.B., Garrigues P. et Barcelo D.** 1995. Degradation of organophosphorous pesticides and their transformation products in estuarine waters. *Environ. Sci. Technol.* 29 : 431-438.
- Landry D.W., Zhao K., Yang G.X.Q., Glickman M. et Georgiadis T.M.** 1993. Antibody catalyzed degradation of cocaïne. *Science*. 259 : 1899-1901.
- Lartiges S. et Garrigues P.** 1993. Determination of organophosphorus and organonitrogen pesticides in water and sediments by GC-NPD and GC-MS. *Analisis*. 21 : 157-165.
- Laubier L.** 1991. Avant-propos dans Toxicologie de l'environnement : effets biologiques des polluants utilisés comme biomarqueurs des contaminations. *Oceanis*. Vol. 17, fascicule 4.
- Lee B.M. et Scott G.I.** 1989. Acute toxicity of temephos, fenoxycarb, diflubenzuron, methoprene and *Bacillus thuringiensis* to the mummychog (*Fundus heteroclitus*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 43 (6) : 827-832.
- Lenoir-Rousseaux J.J., Arpagaus M. et Toutant J.P.** 1988. Separation and characterization of hydrophilic and detergent-interacting components of brain acetylcholinesterase from *Tenebrio molitor*. *L. Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 90 B, N° 1, 29-35.
- Lores E.M., Moore J.C., Moody P., Clark J., Forester J. et Knight J.** 1985. Temephos residues in stagnant ponds after mosquito larvicide applications by helicopter. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 35 : 308-313.
- Massoulié J. et Bon S.** 1982. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Annu. Rev. Neurosci.* 5 : 57-106.

Massoulié J. et Toutant J.P. 1988. Vertebrate cholinesterases: structure and types of interaction. Dans Handbook of experimental pharmacology, Vol.86. Chapitre 8a.197-224. Ed.Springer-Verlag. Berlin.

Massoulié J., Pezzementi L., Bon S., Kejci E. et Valette F.M. 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog. Neurobiol.* **41**, 31-91.

Massoulié J., Sussman J., Bon S. et Silman I. 1993. Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Prog. Brain. Res.* Vol. **98** : 139-146.

Massoulié J., Sussman J., Doctor P., Soreq H., Velan B., Cygler M., Rotundo R., Shafferman A., Silman I. et Taylor P. 1992. Recommendations for nomenclature in cholinesterases.in *Multidisciplinary Approaches to Cholinesterase Functions*. Edited by Shafferman and Velan, Plenum Press, New-York, 285-288.

Matthiessen P., Whale G.F., Rycroft R.J. et Sheahan A.A. 1988. The joint toxicity of pesticides tank-mixes to rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* **13** : 61-76.

Michel P. 1993. L'arsenic en milieu marin. Biogéochimie et écotoxicologie. IFREMER. Repères Océan. No 4.

Michel P., Averty B., Noël J. et Sanjuan J. 1992. Evaluation of dissolved and particulate arsenic flux in the Dover Strait. *Oceanologica acta.* Vol. **16**, No 5, 6 : 585-591.

Mulder J.G. et Bakker J. 1992. Kinetics of inhibition of two forms of acetylcholinesterase from *Panagrellus redivivus* by organophosphorous and carbamate compounds. *Fundam. Appl. Nematol.* **15** (1), 19-23.

Munschy C. 1995. Comportement géochimique des herbicides et de leurs produits de dégradation en milieu estuarien et marin côtier. Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI. 263 pp.

Murty A.S. 1986. Joint action of pesticide mixtures. In "*Toxicity of pesticides to fish*". Vol. **2** : 35-43. CRC Press. Boca Raton. Florida 33431.

Nemcsok J., Nemeth A., Buzas Z.S. et Boross L. 1984. Effects of copper, zinc and paraquat on acetylcholinesterase activity in carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic Toxicol.* **5** : 23-31.

Nemcsok J., Orban L., Dobber L. et Szepealussy J. 1985. Acetylcholinesterase activity measurements as a tool for demonstrating the possible cause of fish decay. *Acta Biol. Szeged.* **31** : 9-12.

Olson D.L. et Christensen G.M. 1980. Effects of water pollutants and other chemicals on fish acetylcholinesterase *in vitro*. *Environ. Res.* **21** : 327-335.

Ordentlich A., Barak D., Kronman C., Ariel N., Segall Y., Velan B. et Shafferman A. 1995. Contribution of aromatic moieties of Tyrosine 133 and of the anionic subsite Tryptophan 86 to catalytic efficiency and allosteric modulation of acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* Vol. **270**, N° 5 : 2082-2091.

Payne J.F., Mathieu A., Melvin W. et Fancey L.L. 1995. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Fields trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Mar. Poll. Bull.* sous presse.

Payne J.F., Melvin W., Mathieu A. et Fancey L.L. 1994. Biomarkers of stress in urban rivers:mixed function oxygenase and acetylcholinesterase effetc in brown trout in rivers in St.John's, Newfounland. *Can. Tech. Rept. Fish. Aquati. Sci.* N° 1947:23 p.

Principato G.B., Taleza V., Giovannini E., Pascolini R. et Rosi G. 1988. Characterization of the soluble cholinesterase from *Squilla mantis*. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. **90C**. N°2. 413-416.

R.N.O. 1995. Réseau National d'Observation de la qualité du Milieu Marin. Surveillance du milieu marin. Travaux du R.N.O. Edition 1995. IFREMER et Ministère de l'environnement. 32 pages.

Readman J.W., Liong Wee Kwong L., Mee L.D., Bartocci J., Nilve G., Rodriguez Solano J.A. et Gonzales Farias F. 1992. Persistent organophosphorous pesticides in tropical marine environments. *Mar. Poll. Bull.* Vol. **24**, N° 8, 398-402.

Reddy P.M. et Philip G.H. 1994. *In vivo* inhibition of AChE and ATPase activities in the tissues of freshwater fish, *Cyprinus carpio* exposed to technical grade cypermethrin. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **52** : 619-626.

- Renton K.W. et Addison R.F.** 1992. Hepatic microsomal mono-oxygenase activity and P450IA in North Sea dab *Limanda limanda* from contaminated sites. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. **91**:65-69.
- Rosenberry T.L., Roberts W.L., Haas R. et Toutant J.P.** 1989. The glycoinositol phospholipid anchor of human erythrocyte acetylcholinesterase. Dans *Molecular and Cell Biology of Membrane Proteins*. Publié par Ellis Horwood Limited. Chap. 7 : 151-165.
- Sancho E., Ferrando M.D., Andreu E. et Gamon M.** 1993. Bioconcentration and excretion of diazinon by eel. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **50** : 578-585.
- Silman I., Harel M., Axelsen P., Raves M. et Sussman J.** 1994. Three-dimensional structures of acetylcholinesterase and of its complexes with anticholinesterase agents. Dans *Structure, Mechanism and Inhibition of Neuroactive Enzymes*. Vol. **22** : 745-749.
- Sine J.P., Toutant J.P., Weigel P et Colas B.** 1992. Amphiphilic forms of butyrylcholinesterase in mucosal cell of rat intestine. *Biochemistry* **31** : 10893-10900.
- Singh D.K. et Agarwal R.A.** 1987. Effect of the synthetic pyrethroid permethrin on the snail *Lymanea.acuminata*. *Sci. Total. Environ.* **67** : 263-267.
- Sprague J.B.** 1970. Measurement of pollutant toxicity to fish. II. Utilizing and applying bioassay results. *Water Res.* Vol. **4** : 3-32.
- Stebbing A.R.D. et Dethlefsen V.** 1992. Introduction to the Bremerhaven Workshop on Biological Effects of Contaminants. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. **91** : 1-8.
- Stieger S., Gentinetta R. et Brodbek U.** 1989. Cholinesterases from flounder muscle. Purification and characterization of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored and collagen-tailed forms differing in substrate specificity. *Eur.J.Biochem.* **181**. 633-642.
- Sussman J., Harel M., Frolow F., Oefner C., Goldman A., Toker L. et Silman I.** 1991. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica* : A prototypic acetylcholine-binding protein. *Sciences*, Vol. **253** : 872-879.

Szabo A., Nemcsok J., Asztalos B., Rakonczay Z., Kasa P. et Le Huu Hieu 1992. The effects of pesticides on carp (*Cyprinus carpio*) acetylcholinesterase and its biochemical characterization. *Ecotox. Environ. Safe.* **23** : 39-45.

Szeto S.Y., Sundaram K.M.S. et Feng J. 1985. Inhibition of brain AChE in brook trout by aminocarb and its toxic metabolites. *J. Environ. Sci. Health, B* **20** (5):559-575.

Talesa V., Contenti S., Mangiabene C., Pascolini R., Rosi G. et Principato B. 1990. Propionylcholinesterase from *Murex brandaris* : comparison with other invertebrate cholinesterases. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. **96 C**. N° 1, 39-43.

Talesa V., Grauso M., Giovannini E., Rosi G. et Toutant J.P. 1995a. Acetylcholinesterase in tentacles of *Octopus vulgaris* (Cephalopoda). Histochemical localization and characterization of a specific high salt-soluble and heparin-soluble fraction of globular forms. *Neurochem. Int.* Vol.**27**, N°2.201-211.

Talesa V., Grauso M., Giovannini E., Rosi G. et Toutant J.P. 1995b. Solubilization, molecular forms and substrate specificity of two acetylcholinesterases in the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*). *Biochem. J.* **306** : 687-692.

Taylor P., Radic Z., Kreienkamp H.J., Maeda R., Luo Z., Fuentes M.E., Vellom D. et Pickering N. 1994. Expression and ligand specificity of acetylcholinesterase and the nicotinic receptor : a tale of two cholinergic sites. In Structure, mechanism and inhibition of neuroactive enzymes. Vol. **22** : 740-746.

Thain J.E., Matthiessen P et Bifield S. 1990 The toxicity of dichlorvos to some marine organisms. ICES. *Marine Environmental Quality Commitee*. CM 1990/E:18.15 p.

Thirugnanam M. et Forgash A.J. 1975. Environmental impact of mosquito pesticides : influence of temefos on the brain acetylcholinesterase of Killifish. *Environ. Physiol. Biochem.* **5** : 451-459.

Toutant J.P. 1989. Insect acetylcholinesterase : catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. *Prog. Neurobiol.* Vol. **32** : 423-446.

Toutant J.P. et Massoulié J. 1988a. Cholinesterases:tissue and cellular distribution of molecular forms and their physiological regulation. In Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. **86**. Springer-Verlag. Berlin.

Toutant J.P., Arpagaus M et Fournier D. 1988b. Native molecular forms of head acetylcholinesterase from adult *Drosophila melanogaster*:quaternary structure and hydrophobic character. *J.Neurochem.* **50**. 209-218.

Tronczynski J. 1990. Programme de recherche sur les produits phytosanitaires en zones littorales et estuariennes. IFREMER. DRO-90-05-MR. Nantes.

Tully O. et Morrissey D. 1989. Concentrations of dichlorvos in Beirtreach Bui Bay, Ireland. *Mar. Poll. Bull.* Vol **20**, N° 44, 190-191.

UNEP. 1991. Mediterranean Action Plan. Med Pol. Assessment of the state of pollution of the Mediterranean sea by organophosphorous compounds. Evaluation de l'état de pollution de la mer Méditerranée par les composés organophosphorés. MAP Technical Reports Series N°**58**. 122p. Athens. Grèce.

UNESCO 1986. A report on the IOC/GEEP workshop on the biological effects of pollutants held at the University of OSLO, NORWAY. August, 1986.

Vellom D.C., Radic Z., Li Y., Pickering N.A., Camp S. et Taylor P. 1993. Amino acid residues controlling acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase specificity. *Biochemistry*, Vol. **32**, N° 1, 12-17.

Von Wachtendonk D. et Neef J. 1979. Isolation, purification and molecular properties of an acetylcholinesterase from the haemolymph of the sea mussel, *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. **63 C**, 279-286.

W.H.O. 1986. IPCS. International Programme on Chemical Safety. Organophosphorous insecticides, a general introduction. *Environmental Health Criteria*. 63. OMS. Genève.

W.H.O. 1986. IPCS. International Programme on Chemical Safety. Carbamate pesticides: a general introduction. *Environmental Health Criteria* 64. OMS. Genève.

W.H.O. 1989. IPCS. International Programme on Chemical Safety. Cypermethrin. *Environmental Health Criteria* 82. OMS. Genève.

Wang T.C., Lenahan R.A. et Tucker J.W. 1987. Deposition and persistence of aerially applied fenthion in a Florida estuary. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **38** : 226-231.

Weise C., Kreienkamp H.J., Raba R., Pedak A., Aaviksaar A. et Hucho F. 1990. Anionic subsites of the acetylcholinesterase from *T. californica* : affinity labelling with the cationic reagent N, N-dimethyl-2-phenyl-aziridinium. *The EMBO Journal*. Vol. **9**, N° 12, 3885-3888.

Weiss C.M. 1965. Use of fish to detect organic insecticides in water. *Journal WPCF*. Vol. **37**, N° 5, 647-658.

Weiss C.M. et Gakstatter J.H. 1964. Detection of pesticides in water by biochemical assay. *Journal WPCF* Vol. **36**, N° 2 : 240-252.

Wilbur K.M. 1983. The Mollusca. Vol.4. Physiology Part 1. Editeurs Saleuddin et Wilbur. Academic Press. New-York, Londres.

Yawetz A., Manelis R. et Gasith. 1993. Cholinesterase enzymatic profiles and the exposure of fish to organophosphorus and carbamate pesticides in Israel. *Wat. Sci. Tech.* Vol. **27**, N° 7-8. 465-472.

Zinckl G.J., Shea P.J., Nakamoto R.J. et Callman J. 1987. Brain cholinesterase activity of rainbow trout poisoned by carbaryl. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **38** : 29-35.

PUBLICATION 6 :

**Cholinesterase inhibition by organophosphorus
and carbamate compounds**

**Sous-presse pour Techniques In Marine Environmental Science
1995**

Ce document constitue la méthode de référence de l'analyse des activités des cholinestérases appliquée au milieu marin et est publié sous l'égide du Conseil International pour l'Exploitation de la Mer.

TECHNIQUES IN MARINE ENVIRONMENTAL SCIENCES

**CHOLINESTERASE INHIBITION BY ORGANOPHOSPHORUS AND CARBAMATE
COMPOUNDS**

Gilles BOCQUENÉ and François GALGANI

**IFREMER DEL/EX
BP 1049
44037 NANTES CEDEX
FRANCE**

The recent development of biomarkers based on the study of biological responses of organisms exposed to pollutants has provided the biochemical tools essential to the implementation of programs for the monitoring of contaminants effects. At the initiative of ICES and UNESCO-IOC study groups, several international workshops have advocated the development of biochemical methods for pollutant monitoring programme in the marine environment.

The development of a biomarker depends on numerous factors:

- specificity of the response
- natural variability of the response
- choice of the target species

Among the major contaminants in the marine environment, insecticides can cause serious ecotoxicological problems because of their strong persistence (organochlorines) or high toxicity (organophosphates and carbamates). Although the transfer of these pollutants to the marine environment is generally diffuse and chronic, an accident, such as the loss of several tons of carbamates (furathiocarb) from a ship at sea and their subsequent washing up on French coasts in December 1993 and January 1994, can constitute a serious ecological and economic danger requiring specific monitoring tools.

Acetylcholinesterase (AChE/EC 3.1.1.7.) inhibition has been used as a biomarker of the effects of organophosphorus compounds (OP) and carbamates (C) (Coppage and Braidech, 1976; Nemcsok et al., 1985; Zinkl et al., 1987; Day and Scott, 1990). The existence of extremely low thresholds for induction of inhibitory effects suggests that detection is possible after exposure to insecticide concentrations of around 0.1 to 1 µg/l (Klaverkamp and Hobden, 1980; Habig et al., 1986). Data concerning the levels of these pollutants in the different marine compartments are scarce, but studies on sediment and living matter have revealed concentrations above the induction threshold (Barcelo et al., 1991).

SOUS PRESSE POUR TECHNIQUES IN MARINE ENVIRONMENTAL SCIENCES-1995.

A few studies on the characterization of AChE from different marine species have been published (Coppage and Braidech, 1976; Bocquené et al, 1990.). Other work concerning the preparation, storage and handling of samples is available (Finlayson and Rudnicki, 1985).

1. ORGANOPHOSPHATES AND CARBAMATES

Organophosphates (OP) and carbamates (C) are mainly used in agriculture as insecticides, in addition they are used as biocides in household products. Both OP and C are widely used and are characterized as being acutely toxic but relatively nonpersistent compounds. More than 100 different molecules of OP and 50 molecules of C are known. OPs such as parathion, malathion, fenitrothion, phosalone, dichlorvos (vapona), chlorpyrifos and carbamates such as carbaryl, carbofuran, aldicarb, carbofuran, propoxur are some of the most widely used insecticides. The annual consumption of OP and C reached 3 000 tons in France in 1989. OP and C represent 60 to 70 % of total insecticides.

OP and C are toxic to most organisms by their ability to inactivate the enzymes known as cholinesterases (ChEs) and especially acetylcholinesterase (AChE), by taking the place of the natural substrate of the enzyme. Depending upon chemical structure and formulation, the toxicity of carbamate and OP insecticides can vary from only slightly to extremely toxic. Many OP compounds contain the thiono moiety (=S) rather than the oxon moiety (=O). The thiono type OP are not potent inhibitors of ChEs but require metabolic activation to form the active oxon analogues that occur through bioactivation (MFO system). The liver, the brain and the lung contain the greatest capacity for bioactivation, and this may be of significance since such tissues are target organs.

Carbamates insecticides and some OP are direct inhibitors of ChEs.

OP are generally considered irreversible inhibitors of ChE activity whereas carbamates are slowly reversible inhibitors. Aging produces a time dependent change in certain OP insecticides that results in extremely tight binding to ChE such that it is essentially irreversible.

2. ACETYLCHOLINESTERASE

AChE is present in most animals and is responsible for the rapid hydrolytic degradation of the neurotransmitter acetylcholine (ACh) into the inactive products choline and acetic acid. The role of AChE in cholinergic transmission is to regulate the nervous transmission by reducing the concentration of ACh in the junction through AChE-catalysed hydrolysis of ACh. When AChE is inactivated by an organophosphorus or carbamate ester, the enzyme is no longer able to hydrolyze ACh and the concentration of ACh in the junction remains high. Continuous stimulation of the muscle or nerve fiber then occurs, resulting in tetany and eventually paralysis and death. It should be pointed out that there is another type of cholinesterase family beside AChE, namely pseudocholinesterases.

AChE has the highest specificity for ACh of any other choline ester and pseudocholinesterase has the highest specificity for butyrylcholine. AChE is commonly found in nervous tissues, brain, red blood cells and muscle tissues, while pseudocholinesterase is found in plasma, liver and pancreas where its physiological role is not well defined. It must be noted that the two enzymes differ by just one amino acid in the esterase site and both are inhibited by OP and C.

The presence of AChE has been demonstrated in a variety of tissues of marine organisms including fish muscle and brain, adductor muscle and gills of shellfish and abdominal muscle of crustaceans, the highest activities being found in the brain and muscle of fish and in the muscle of prawn. Molluscs show low activity.

3. AChE INHIBITION MEASUREMENTS

3-1. Extraction

Extraction is performed on fresh or frozen tissue (0.1 to 1 g of tissue is enough) using 0.02M PB buffer pH 7.0 (Ellman et al., 1961; Lundin, 1967; Wang and Murphy, 1982). The tissue is homogenized 1/1 to 1/4 w/v depending on the species or organ (for example fish brain tissue has a higher specific AChE activity than muscle) for 1 min using an Ultra Turrax. Extracts are then centrifuged at 10 000 g for 20 min. Supernatants are used as the AChE source. Samples can be stored at either -85° C or -20 ° C without significant loss of activity.

3-2. Protein determination

Bradford's method (1976) can be used for quantitative determination using bovine serum albumen (B.S.A.) as protein standard. This method is adapted to be used with a microplate reader. For each microplate well 280 µl of Bradford's reagent (phosphoric acid, methanol and Coomassie brilliant blue) are added to 100 µl of appropriate dilution of sample. Protein standard curve (1 to 10 µg/µl) is prepared each time the assay is performed diluting lyophilized bovine serum albumen with distilled water. Rehydrated protein can be stored up to 60 days at 4°C. Dilution of the concentrated Bradford's reagent (commercially available) with distilled water will be utilized within 2 weeks. The color development is stable for one hour. Absorbance is read at 595 nm and sample concentration is calculated from the standard curve. Results are given as mg/ml or µg/µl of crude extract.

3-3. AChE activity

3-3-1. Determination of AChE activity

The method used to measure acetylcholinesterase activity has been described by Ellman et al. (1961) and adapted to microplate reading. Using acetylthiocholine iodide (ACTC) as specific substrate, Ellman's method is based on the increase of yellow colour produced from thiocholine when it reacts with dithiobisnitrobenzoate ion (eq. 1):

Acetylcholinesterase

Acetylthiocholine -----> thiocholine + acetic acid

Thiocholine + DTNB -----> formation of TNB (yellow color (412 nm))

To each well of the microplate 340 μ l of 0.02 M phosphate pH 7 buffer, 20 μ l of 0.01 M DTNB (0.5 mM final concentration) and 10 μ l of crude extract are successively added. After a period of incubation of 5 minutes between the extract and the reagent DTNB (allowing reaction of DTNB with sulphhydryl groups of aminoacids) 10 μ l of 0.1 M ACTC (2.6 mM final concentration) are added before enzymatic reaction is started (AChE is subject to substrate inhibition at 10 mM final concentration of ACTC). All reagents are brought to room or controlled temperature prior to use. The enzyme kinetic is monitored on a microplate reader at 412 nm (from 405 nm to 420 nm). Wells without enzymatic extract (buffer+DTNB+ACTC) are used to estimate the spontaneous hydrolysis of ACTC and values are subtracted from the absorbance increase of enzymatic samples. Assay can be run from 1 to several minutes depending on the reaction velocity of the enzyme that depends itself of the selected species.

3-3-2. Calculation of AChE activity

Non enzymatic hydrolysis of substrate is subtracted from the absorbance increase per minute. Conversion of absorbance in Units of activity, one Unit of activity is defined as the amount of enzyme which catalyses the hydrolysis of 1 μ mole of acetylthiocholine minute^{-1} mg protein^{-1} , is calculated following the formula (eq.2):

$$\text{AChE activity (} \mu\text{mol ACTC mn}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}\text{)} = \frac{\Delta A_{412} \times Vol_T \times 1000}{1.36 \times 10^4 \times \text{lightpath} \times Vol_S \times [\text{protein}]}$$

where:

ΔA_{412} = Change in absorbance (O.D.) per mn

Vol_T = Total Assay Volume (0.380 ml)

1.34×10^4 = Extinction coefficient of TNB

lightpath = microplate well depth (1 cm)

Vol_S = Sample Volume (in ml)

$[\text{protein}]$ = concentration of protein of the enzymatic extract (mg/ml)

Using a microplate all assays can be easily duplicated. When assays are performed in quadruplicate a variation coefficient of 6% is regularly obtained depending on the operator expertise.

Storage conditions for reagents are as follow: dessicated ACTC must be stored at less than 0° C and 0.1 M ACTC stock solution is prepared in distilled water just prior to use.

0.01 M DTNB is prepared in 0.02 M phosphate pH 7 buffer and can be used for several days when stored at 4° C.

3-4. Species selection and sampling conditions

The nomination of a species to use in monitoring is restrictive because it depends very much on the problem/area being monitored. However the species must be widely distributed, its biology should be well known, it should be sedentary and it must show a detectable AChE activity. Furthermore, it is important to know the natural limits of variability in AChE activity in the species of interest, in order that the magnificence of observed depression in activity can be assessed. Although few factors are known to affect the level of AChE activity, knowledge of possible variations related to sex, size, state of gonadal maturation and the influence of seawater temperature should be systematically listed. Most benthic fishes (muscle and brain), crustaceans (abdominal muscle) and bivalves (adductor muscle and gills) offer potential for monitoring of AChE activity. Assays must be performed on individuals of known age (size) and sex and all the samples should be analysed under the same conditions at the same time. Following ICES recommendations (ICES, 1992), the number of samples required is a minimum of 6 to 10 animals per site.

3-5. Example of field data

The ICES-IOC International Workshop on Biological Effects of Contaminants that took place in Bremerhaven during March 1990 gave the opportunity to test AChE inhibition as an index of marine contamination.

One of the two locations was the German Bight Transect that consisted of 7 stations running northwest from a point off the mouths of the rivers Weser and Elbe (stations 1 and 3) to the most offshore station located over the Dogger Bank (station 9), traversing a known contaminant gradient.

The specific activity of AChE was determined for the muscle of ten dabs (*Limanda limanda*) from each station. The AChE activity varied according to the expected pollution gradient (Fig. 1). The most marked effects were noted at station 3 while the activity increased from station 3 to station 8 where the highest activity was found. AChE activity decreased at Station 9 when compared with station 8, but it is not known if this decrease is within the natural limits of variability of dab. The effects observed may indicate the presence of organophosphorus or carbamate molecules known to be the strongest cholinesterase inhibitors. Some very limited data do exist about the presence of these compounds in the North Sea (Fig. 2). Up to 0.5 µg/l of methyl parathion has been measured in the mouth of the Elbe river, but it is not known whether the much lower levels observed offshore could account for the effects observed on the Bremerhaven transect.

Acetylcholinesterase inhibition has mainly been used to monitor effects of insecticides in terrestrial environments, forests and fresh water (Williams and Sova, 1966; Gelman and Herzberg, 1979; Day and Scott, 1990.), for instance Payne et al. (1994) have observed 50% inhibition of brown trout AChE captured in an urban polluted river. In the marine environment, AChE inhibition in problem-oriented monitoring is now used to control impact of dichlorvos used locally by salmon farmers as a parasitic control agent.

INTERPRETATION OF RESULTS

If the natural variability of AChE is not directly related to age, sex or reproduction period in most mature fishes (certain early stages are known to show high cholinesterase activities), the temperature of the environment and that of the assay have a determinant effect (Hogan, 1970). Constant attention should be given to the control of these two variables. In the field, samples should be obtained synchronously within a time-scale of several days and in comparable climatic conditions, especially with regard to temperature of the seawater.

Only stations in the same geographical area should be compared.

Most OP and C show very high affinity for AChE. Recent studies (Table 1) indicate high inhibitory activity of several OP and C on AChE extracts of marine organisms (Bocquené et al., 1994). Thus the IC₅₀ of carbofuran (concentration inducing 50% inhibition) on the AChE of the common prawn (*Palaemon serratus*) was 1.1×10^{-8} M (2.4 µg/l) and 2.8×10^{-8} M (6.2 µg/l) for the AChE of dragonet (*Callionymus lyra*). Carbaryl (C) and phosalone (OP) induced a significant inhibitory effect in AChE of common prawn at a concentration of 0.1 µg/l after 29 days of contact.

Although numerous insecticide formulations contain several different molecules, there are few data on the potentiation of their effects on AChE. A recent study (Bocquené et al., 1994) showed that the effects of the combinations, by pair, of 5 organophosphates and carbamates were synergistic, i.e., the total inhibitory effect was greater than the addition of the respective effects of each compounds (Table 2). The strongest synergy was obtained with OP/C associations rather than OP/OP or C/C association. Moreover synergistic effects were closely related to the length of time the enzymatic extract was incubated with the inhibitory mixtures, tending to be stronger as incubation time increased. For many combinations, for example carbaryl/phosalone, dichlorvos/carbofuran or phosalone/carbofuran, inhibitory effects were enhanced tenfold.

Organophosphate and carbamate insecticides are strong inhibitors of acetylcholinesterase but other chemicals can result in *in vitro* inhibition. Among inorganic chemicals, arsenate and arsenite ions (4-11 mg/l), mercuric chloride (6mg/l) and copper chloride show an inhibitory effect on the AChE of the common prawn, the sole and the dragonet but no inhibitory effect was observed with zinc, cadmium and tributyltin chlorides, even at 10 mg/l. In the same way cholinergic acting neurochemical agents (atropine, nicotine) have a moderate inhibitory effect (Olson and Christensen, 1980). But, if some of these compounds are not important marine pollutants (neurochemical agents), the concentration required to cause inhibition of AChE from those that are known to be toxic (arsenic ions) is so large that it is unlikely to be found in the environment even in sediment. Indeed, concentrations of OP and C required to cause 50% reduction of enzyme activity (IC₅₀) are in the range of 10^{-5} to 10^{-9} M. No inhibitory effect was observed for other pesticides such as organochlorines (DDT, lindane) or herbicides (atrazine, isoproturon).

Some algal toxins have been reported to be strong AChE inhibitors. These anatoxins are mainly produced by algal blooms of cyanobacteria : *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena flos-aquae* and *Aphanizomenon flos-aquae*. These three species are fresh water organisms, and although they support brackish waters (up to 8‰ salinity), they have never been found in marine waters. Anatoxin- a(s) is a potent anticholinesterase agent but it is only released by the cyanobacteria *Anabaena flos-aquae* and not by any other known species (Carmichael,1994).Nevertheless , to avoid confounding factor it is recommended that the presence and identity of algal blooms should be noted when the samples are collected.

Unfortunately, few data on contamination levels of OP and C are available. Such information appears to be essential to link the variation in cholinesterase activity with the presence of organophosphates and carbamates.

REFERENCES

- Barcelo, D., Sole, M., Durand, G. and Albaiges, J.(1991). Analysis and behaviour of organophosphorous pesticides in a rice crop field. *Fresenius J.Anal.Chem.* **339**:676-683.
- Bocquené, G., Galgani, F. and Truquet, P.(1990). Characterisation and assay conditions for the use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. *Mar. Environ. Res.* **30**:75-89.
- Bocquené, G., Bellanger, C. and Galgani, F.(1994). Joint action of combinations of pollutants on the acetylcholinesterase activity of several marine species. *Ecotoxicology*. (In press).
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive assay of protein utilizing the principle of dye binding. *Analyt. Biochem.* **772**:248-264.
- Carmichael, W.(1994). Les toxines des cyanobactéries. *Pour la Science*, N°197. March 1994. (*Pour la Science* is the french issue of *Scientific American*).
- Coppage, D. L. and Braidech T. E. (1976). River pollution by anticholinesterase agents. *Water Res.*, **10**:19-24.
- Day, K. E. and Scott, I. M.(1990). Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides. *Aquatic Toxicol.* **18**:101-114.
- Ellman, G. L., Courtney, K. O., Andres, V. and Featherstone, R. M.(1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**:88-95.
- Finlayson, B. L. and Rudnicki R. A. (1985). Storage and handling as a source of error in measuring fish acetylcholinesterase activity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **35**,790-795.
- Gelman A. and Herzberg A. (1979). A field method to certify whether fish died from poisoning by acetylcholinesterase inhibition. *Bamidgeh.* **31**(1)18-20.
- Habig, C., Di Giulio, R. T., Nomeir A. A. and Abou-Donia A, M. B.(1986). Comparative toxicity, cholinergic effects and tissue levels of S,S,S,-Tri-n-Butyl Phosphorotrithioate (DEF) to Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and Blue crab (*Callinectes sapidus*). *Aquatic Toxicol.* **9**:193-206.
- Hogan J. W., 1970. Water temperature as a source of variation in the specific activity of brain cholinesterase of bluegills. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **5**,347-354.
- ICES (International Council for the Exploration of the Sea), 1992. Report on the working group on biological effects of contaminants. 30 April-8 May. General secretary ICES. Paleagade 2-4.D.K.1261. Copenhagen. Denmark C.M.1992/poll:5Ref.:E.

Klaverkamp, J. F. and Hobden, B. R. (1980). Brain acetylcholinesterase inhibition and hepatic activation of acephate and fenitrothion in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* Vol. **37**:1450-1453.

Nemcsok, J., Orban, L., Dobber, L., and Szepealussy, J., (1985). Acetylcholinesterase activity measurements as a tool for demonstrating the possible cause of fish decay. *Acta Biol. Szeged.* **31**:9-12.

Olson, D. L. and Christensen, G.M. (1980). Effects of water pollutants and other chemicals on fish acetylcholinesterase in vitro. *Environ. Res.* **21**:327-335.

Payne, J.F., Melvin, W., Mathieu, A. and Fancey, A. (1994). Biomarkers of stress in urban rivers: mixed-function-oxidase and acetylcholinesterase effects in brown trout in rivers in St. John's, Newfoundland. *Can. Tech. Rept. Fish. Aquat. Sci.* N° **1947**:23 p.

Wang, C. and Murphy, S.D. (1982). Kinetic analysis of species difference in acetylcholinesterase sensitivity to organophosphate insecticides. *Toxicol. and Applied Pharmacol.* **66**,409-419.

Williams, A. K. and Sova, C.R. (1966). Acetylcholinesterase levels in brains of fishes from polluted waters. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* Vol. **1**. N° **5**:198-204.

Zinckl, G.J., Shea, P.J., Nakamoto, R.J. and Callman, J., (1987). Brain cholinesterase activity of rainbow trout poisoned by carbaryl. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **38**:29-35.

	Dragonet	Sole	Prawn	Oyster
Carbaryl	3.0×10^{-7} $\pm 0.7 \times 10^{-7}$ (6)	7.8×10^{-6} $\pm 0.3 \times 10^{-6}$ (3)	1.7×10^{-7} $\pm 0.6 \times 10^{-7}$ (4)	1.5×10^{-7} $\pm 0.5 \times 10^{-7}$ (5)
Carbofuran	2.8×10^{-8} $\pm 0.7 \times 10^{-8}$ (7)	8.0×10^{-7} $\pm 0.5 \times 10^{-7}$ (3)	1.1×10^{-8} $\pm 0.3 \times 10^{-8}$ (5)	1.5×10^{-8} $\pm 0.5 \times 10^{-8}$ (5)
Dichlorvos	2.3×10^{-8} $\pm 0.4 \times 10^{-8}$ (5)	3.1×10^{-7} $\pm 0.8 \times 10^{-7}$ (6)	1.1×10^{-6} $\pm 0.2 \times 10^{-6}$ (5)	7.3×10^{-8} $\pm 1.0 \times 10^{-8}$ (6)
Fenitrothion	2.6×10^{-5} $\pm 0.5 \times 10^{-5}$ (4)	1.2×10^{-4} $\pm 0.3 \times 10^{-4}$ (5)	$> 10^{-4}$	1.4×10^{-4} $\pm 0.2 \times 10^{-4}$ (5)
Phosalone	6.2×10^{-7} $\pm 1.5 \times 10^{-7}$ (5)	2.5×10^{-6} $\pm 0.7 \times 10^{-6}$ (4)	$> 10^{-4}$	$> 5 \times 10^{-4}$

Table 1. Concentration values in M (mean + SD) of several organophosphate and carbamate insecticides causing 50% AChE inhibition (IC 50) after one- hour incubation. Numbers in brackets are replicates.

		Carbofuran	Dichlorvos	Fenitrothion	Phosalone
Carbaryl	Dragonet	0.72 ± 0.06	0.50 ± 0.04	0.58 ± 0.05	0.75 ± 0.02
	Sole	0.74 ± 0.06	0.38 ± 0.03	0.36 ± 0.02	0.20 ± 0.01
	Prawn	0.76 ± 0.07	0.70 ± 0.05	nd	nd
	Oyster	0.72 ± 0.05	0.72 ± 0.05	0.56 ± 0.04	nd
Dichlorvos	Dragonet	0.42 ± 0.03			
	Sole	0.24 ± 0.01			
	Prawn	0.34 ± 0.03			
	Oyster	0.76 ± 0.08			
Fenitrothion	Dragonet	0.28 ± 0.02	0.66 ± 0.06		
	Sole	0.45 ± 0.03	0.54 ± 0.03		
	Prawn	nd	nd		
	Oyster	0.45 ± 0.04	0.68 ± 0.06		
Phosalone	Dragonet	0.30 ± 0.02	0.20 ± 0.01	1.10 ± 0.09	
	Sole	0.22 ± 0.01	0.58 ± 0.03	0.25 ± 0.02	
	Prawn	nd	nd	nd	
	Oyster	nd	nd	nd	

Table 2: Joint toxicity of organophosphorus and carbamate mixtures on AChE from different marine organisms. Results are given in Toxic Units ± S.D. of 4 determinations, nd = values not determinable.

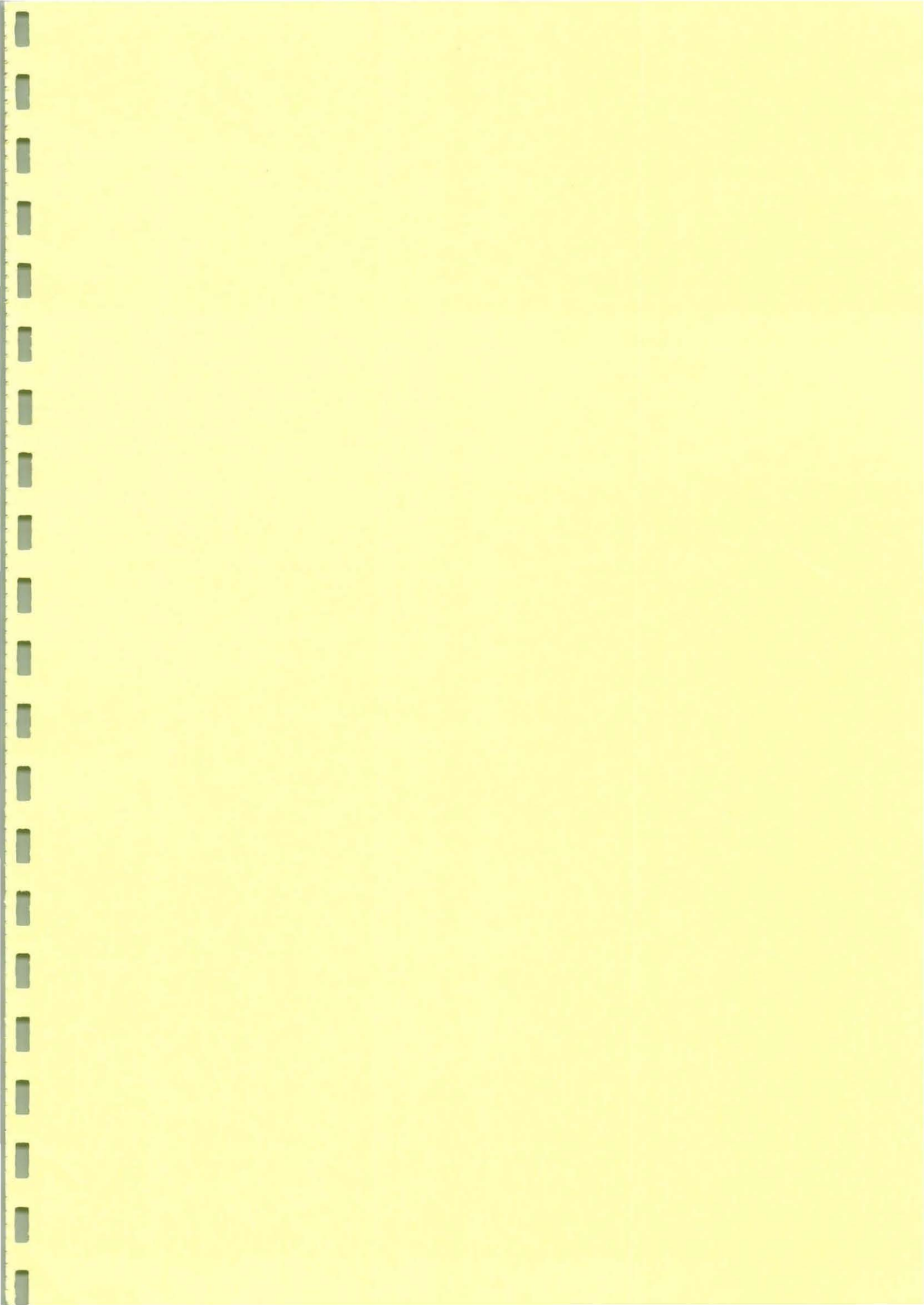
The type of joint action was determined according to the following formula:

$$x \text{ TU}_A + y \text{ TU}_B = 1 \text{ TU (A+B)}$$

where TU is the toxic unit, one unit of toxicant represents the IC₅₀ of a cholinesterase inhibitor (OP or C) A and B the AChE inhibitors (OP, C), and x and y the proportional toxic units of A and B present in the mixture (e.g. 0.5 A + 0.5 B, in this case x=0.5 and y=0.5).

If the addition of half the concentration of toxicant A necessary to produce IC₅₀ and half the concentration of toxicant B necessary for the same response just causes the IC₅₀, A and B are exactly additive, if it causes more than the expected response, e.g. more than 50% inhibition, the joint action is synergistic. (The lower the T.U., the higher the synergistic action of the two inhibitors)

Thus: if $x + y = 1$, the joint action is additive;
 if $x + y < 1$, the joint action is synergistic (the lower total $x+y$ is, the higher the synergistic action);
 if x or $y > 1$, the action is antagonistic.



LISTE DES PUBLICATIONS

Bocquené G., Galgani F. et Truquet P. 1990. Characterisation and assay conditions for the use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. *Marine Environmental Research*. **30** : 75-89.

Bocquené G. et Galgani F. 1990. Utilisation d'un lecteur de plaques pour la mesure rapide de données physicochimiques et enzymatiques simples. *Equinoxe* N°24.32-34.

Bocquené G. et Galgani F. 1991. Acetylcholinesterase activity in the common prawn (*Palaemon serratus*) contaminated by carbaryl and phosalone. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **22** : 337-345.

Bocquené G. et Galgani F. 1991. L'acétylcholinestérase chez les organismes marins : outil de surveillance des pesticides organophosphorés et carbamates. *Oceanis*, Vol.17. Fasc.4.439-448.

Bocquené G. et Galgani F. 1993. Assessment of the biological water quality using acetylcholinesterase (AChE) inhibition measurement. Selected techniques for monitoring biological effects of pollutants in marine organisms. *MAP Technical Report Series* N°71.105-111.

Bocquené G., Galgani F., Burgeot T., Le Déan L. et Truquet P. 1993. Acetylcholinesterase levels in marine organisms along the French coast. *Marine Pollution Bulletin*. Vol.26.N°2. 101-106.

Bocquené G., Bellanger C., Cadiou Y. et Galgani F. 1995. Joint action of combinations of pollutants on the acetylcholinesterase activity of several marine species. *Ecotoxicology* **4**, 266-279.

Bocquené G. et Galgani F. 1995. Cholinesterase inhibition by organophosphorous and carbamate compounds. *Techniques in Marine Environmental Science*. Sous presse.

Bocquené G. et Fournier D. 1995. The molecular forms of acetylcholinesterase from the common oyster (*Crassostrea gigas*). Soumis pour publication.

Galgani F. et Bocquené G. 1988. A method for routine detection of organophosphorous and carbamates in sea water. *Environmental Technology Letters*. Vol. 10 : 311-322.

Galgani F. et Bocquené G. 1990. *In vitro* inhibition of acetylcholinesterase from four marine species by organophosphates and carbamates. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*., 45 : 243-249.

Galgani F. et Bocquené G. 1991. Semi automated colorimetric and enzymatic assays for aquatic organisms using microplate reader. *Water Research*. Vol.25, N°2.147-150.

Galgani F., Cadiou Y. et Bocquené G. 1991. Routine determination of enzyme kinetics using plate reader. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol.38. 434-437.

Galgani F., Bocquené G. et Cadiou Y. 1992. Evidence of variation in cholinesterase activity in fish along a pollution gradient in the North Sea. *Marine Ecology Progress Series*. Vol. 91, No 1 to 3 : 77-82.

Burgeot T., Bocquené G., Truquet P., Le Déan L., Poulard J.C., Dorel D., Souplet A. et Galgani F. 1993. The dragonet *Callionymus lyra*, a target species used for evaluation of biological effects of chemical contaminants on French coasts. *Marine Ecology Progress Series*. Vol.97. 309-316.

Burgeot T., Bocquené G., Truquet P., Le Déan L. et Galgani F. 1994. Induction of EROD activity in red mullet (*Mullus barbatus*) along the French Mediterranean coasts. *The Science of Total Environment*. 142.213-220.

Burgeot T., Bocquené G., Pingray G., Godefroy D., Legrand J., Dimeet J., Marco F., Vincent F., Henocque Y, Oger-Jeanneret H. et Galgani F. 1994. Monitoring biological effects of contamination in marine fish along French coasts by measurements of EROD activity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 29, 131-147.

Le Bris H, Maffart P., Bocquené G., Buchet V., Galgani F. et Blanc G. 1995. Laboratory study on the effect of dichlorvos on two commercial bivalves. *Aquaculture*. Sous-presse.

Galgani F, Burgeot T, Bocquené G., Vincent F., Léauté J.P., Labastie J., Forest A. et Guichet R. 1995. Distribution and abundance of debris on the continental shelf of the bay of Biscay and in Seine bay. *Marine Pollution Bulletin*. Vol.30. N°1.58-62.

Galgani F, Bocquené G. et Burgeot T. 1995. Acetylcholinesterase and EROD from *Acanthurus bahianus* from Martinique Island (French West Indies). Soumis à *Biomarker*.