

ANPP - 4ème CONFERENCE INTERNATIONALE SUR LES  
RAVAGEURS EN AGRICULTURE  
MONTPELLIER 6-7-8 JANVIER 1997

**L'ACÉTYLCHOLINESTÉRASE DANS LE SYSTÈME OLFACTIF DE  
LA CARPE *CYPRINUS CARPIO* L. (POISSON, CYPRINIDAE):  
UTILISATION COMME BIOMARQUEURS D'EXPOSITION À  
L'ÉGARD DES INSECTICIDES DANS LE MILIEU AQUATIQUE**

**E. HAUBRUGE<sup>1</sup>, B. DE BAST<sup>1</sup>, B. DOMANGE<sup>1</sup>, J. MIGNON<sup>1</sup>, V.  
LIENARD<sup>1</sup>, C. GASPARD<sup>1</sup> & J.-P. TOUTANT<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> UER de Zoologie générale et appliquée, Faculté universitaire des Sciences  
agronomiques de Gembloux, B-5030 Gembloux, Belgique

<sup>2</sup> Laboratoire de Différenciation Cellulaire et Croissance, INRA, Montpellier, France

**RESUME:**

L'acétylcholinestérase (AChE) est utilisée depuis quelques années comme biomarqueur spécifique de l'effet des organophosphorés et des carbamates sur les organismes aquatiques. Ces biocides inhibent l'activité de l'acétylcholinestérase même à de faibles concentrations. L'AChE a été mise en évidence au niveau du cerveau, des muscles, du foie, du cœur, des rosettes olfactives et du bulbe olfactif de la carpe commune *Cyprinus carpio*. L'AChE présente dans les rosettes olfactives constitue un excellent biomarqueur d'exposition pour détecter la présence d'organophosphorés et de carbamates; en effet, l'organe olfactif est directement en contact avec les polluants présents dans le milieu aquatique. L'exposition de carpes à une concentration sublétales de 5 ppb de carbofuran pendant 24 heures montre une inhibition de l'activité AChE de  $27,3 \pm 5,1$  %; de  $17,0 \pm 35$  %, de  $15,7 \pm 4,2$  % et de  $24,2 \pm 11,1$  % respectivement dans les rosettes, le bulbe olfactif, le cerveau et le foie.

**Mots-clés:** acétylcholinestérase, système olfactif, *Cyprinus carpio*, insecticide, environnement

**SUMMARY:**

Acetylcholinesterase, an enzyme regulating nerve-impulse transmission, is reported to be inhibited by carbamates and organophosphates in many living systems including aquatic organisms. AChE is also present in the entire olfactory organ of the common carp *Cyprinus carpio*. The reduction of olfactory organ AChE activity is already perceptible at carbofuran concentration of 5 ppb. After 24 hours the results show an AChE inhibition of  $27,3 \pm 5,1$  %;  $17,0 \pm 35$  %;  $15,7 \pm 4,2$  % and  $24,2 \pm 11,1$  % respectively for olfactory organ, olfactory bulb, brain and liver. This makes the AChE activity a potential biochemical indicator of toxic stress in fishes and a sensitive test for the presence of carbamates and organophosphates in water.

**Keywords:** acetylcholinesterase, olfactory system, *Cyprinus carpio*, insecticide, environment,

1003

## INTRODUCTION

Ces deux dernières décennies, le développement des biotechnologies a permis de préciser l'origine et le rôle comportemental des substances chimiques chez les poissons (SCHERER, 1975; SCHUMACHER et NEY, 1980 et SAGLIO, 1986). Ce domaine de recherches présente un grand intérêt pour l'aquaculture, la mise au point de méthodes de pêche plus sélectives et le contrôle des déplacements des populations de poissons en milieu naturel.

Ces perspectives d'avenir se heurtent toutefois aux problèmes soulevés par les concentrations élevées en micropolluants dans le milieu aquatique (GALGANI et al., 1992; ADMIRAL et al., 1993). Les métaux lourds peuvent, à faibles doses, provoquer des altérations olfactives, gustatives et comportementales chez les poissons. Une brève exposition au mercure ( $HgCl_2$ ) à la concentration  $10^{-4}$  M pendant 10 secondes suffit pour inhiber la sensibilité olfactive de *Oncorhynchus gorbuscha* aux acides aminés pendant plus d'une heure (SUTTERLIN, 1974).

L'organe olfactif, présent sur le bord antérieur de l'œil de la carpe, est directement en contact avec le milieu aquatique et ne possède pas de barrière de protection contre les substances xénobiotiques (SUTTERLIN, 1974).

Parmi les biomarqueurs, l'acétylcholinestérase (AChE; EC 3.1.1.17.) a été largement étudiée et utilisée pour mesurer l'impact des organophosphorés et des carbamates sur le milieu aquatique (HABIG et DI GIULIO, 1991; SZABO et al., 1992 et BOCQUENE et al., 1993). L'AChE, l'enzyme responsable de l'hydrolyse de l'ACh au niveau des synapses cholinergiques, est présente dans le système nerveux de tous les vertébrés (MASSOULIE et BON, 1982) et des invertébrés, à l'exception des formes très primitives (WACHTLER, 1988). Les organophosphorés et carbamates inhibent ces AChEs et perturbent ainsi la transmission cholinergique.

Le but du présent travail a été la mise en évidence de l'AChE dans les rosettes et les bulbes olfactifs de la carpe commune ainsi que l'étude de l'impact de micropolluants à action anticholinergique.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Prélèvement des organes et des tissus

Les carpes (*Cyprinus carpio* L.) ont été élevées à la station de pisciculture expérimentale de la Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux. Pour les expérimentations, nous avons choisi des poissons âgés de deux ans.

Le poisson, ramené vivant au laboratoire, est tué en sectionnant la moëlle épinière à l'arrière de la tête. Le peau située sur la face antérieure de la tête entre les deux narines est incisée au moyen d'un scalpel sur une longueur d'environ 2 à 3 cm. Deux autres incisions sont pratiquées perpendiculairement de part et d'autre des orifices olfactifs. La peau est alors retirée latéralement au moyen de pinces brucelles et les rosettes tapissant les deux cavités olfactives sont prélevées. La boîte crânienne est alors

ouverte afin de prélever les bulbes olfactifs ainsi que la totalité du cerveau. Des échantillons de la peau situés à proximité directe des cavités olfactives sont également prélevés. Le dosage de l'activité AChE des tissus cutanés proches des fosses nasales trouve sa justification dans le souci de vérifier si l'activité AChE mesurée dans la rosette olfactive provient uniquement du tissu olfactif. Au moyen d'un scalpel, une incision longitudinale est ensuite pratiquée de l'anus aux branchies. Les branchies, le foie, le cœur, les reins, un morceau de muscle et la rate ont ensuite été prélevés.

Pour comparer l'activité acétylcholinestérasique des rosettes de la carpe avec celle observée chez la truite (*Oncorhynchus mykiss* WALBAUM) nous avons extrait des rosettes olfactives sur des truites âgées de 2 années.

### 2.2. Préparation des extraits

Pour le dosage des AChEs, les tissus prélevés sont broyés dans un tampon HST (Tris HCl pH 8,0 0,01 M; 1M NaCl; 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 % Triton X-100; EDTA 1mM; 0,1 mg/ml bacitracine) au moyen d'un Potter Elvehjem. Après une centrifugation de 15 mn à 18.000 g et à 4°C, le surnageant est récolté afin d'effectuer les dosages de protéines et des acétylcholinestérases.

### 2.3. Dosage des protéines

La teneur en protéines est évaluée au moyen du 'Protein Standard Test' (Bio-Rad) basé sur la méthode de BRADFORD (1976).

### 2.4. Dosage des acétylcholinestérases

Les acétylcholinestérases ont été dosées selon la méthode de ELLMAN et al. (1961) modifiée par nos soins. Cent microlitres de surnageant sont mélangés à un milieu d'incubation composé de tampon phosphate PB pH 8,0 (0,1 M) et de DTNB (0,01 M). Après une incubation d'une minute, 10 µl d'iodeure d'acétylthiocholine (AcSCh) sont ajoutés pour obtenir une concentration finale de 100 mM. La lecture spectrophotométrique continue de l'absorbance est réalisée pendant 1 minute à 412 nm.

### 2.5. Inhibition "in vitro" de l'activité des cholinestérases

L'effet de trois inhibiteurs: le diisopropyl fluorophosphate (DFP), le BW (Burrows Wellcome) 284C51 (bis (4-allyldiméthyl-ammoniumphényl)penan-3-one, un inhibiteur spécifique de l'AChE), et le carbofuran (2,3-dihydro-2,2-diméthylbenzofuran-7,yl méthylcarbamate) a été testé vis-à-vis de l'activité de l'AChE. Pour chaque inhibiteur, une série de concentrations allant de  $10^{-3}$  à  $10^{-9}$  M ont été préparées. Dans le milieu d'incubation, 10 µl de l'inhibiteur choisi ont été ajoutés après le DTNB et le tampon phosphate PB.

### 2.6. Inhibition "in vivo" des acétylcholinestérases par le carbofuran

Les expérimentations ont été réalisées à la pisciculture expérimentale de la Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux. Un système semi-statique

dans des bassins de polyéthylène d'une contenance de 400 l a été utilisé. A la température de  $12 \pm 2^\circ\text{C}$ , la charge moyenne en carpes est d'environ 1 kg pour 400 l d'eau renouvelée tous les 2 jours. Le carbofuran utilisé est une formulation commerciale de 200 g/l (Curater 200 SC).

Un bassin contient 400 l d'eau traitée au moyen de carbofuran à la dose de 5 ppb tandis qu'un autre d'une même contenance d'eau sert de témoin. Quinze carpes sont placées dans chaque bassin. Après 24 heures, les carpes sont sacrifiées et sont disséquées. L'activité des acétylcholinestérases présentes dans le système olfactif, le cerveau et le foie est ensuite mesurée.

### 3. Résultats

#### 3.1. Activité acétylcholinestérasique dans le système olfactif

L'activité acétylcholinestérasique présente dans les différents organes et tissus de la carpe est montrée à la figure 1.

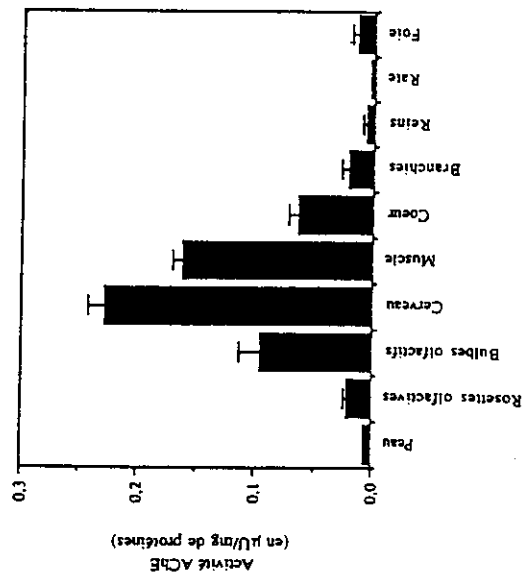


Figure 1: activité acétylcholinestérasique (moyenne  $\pm$  écart-type) présente dans les différents organes et tissus de la Carpe commune *Cyprinus carpio* à  $25^\circ\text{C}$  pendant une minute. Vingt poissons ont été utilisés pour l'expérimentation.

Les rosettes olfactives présentent une activité AChE de  $2.2 \cdot 10^{-5}$  mU/mg de protéines alors que l'activité AChE dans les bulbes et le cerveau est respectivement de  $9.5 \cdot 10^{-5}$  et de  $22.8 \cdot 10^{-5}$  mU/mg de protéines. Le foie, les branchies, le coeur et les muscles possèdent une activité AChE par ordre croissant de:  $1.5 \cdot 10^{-5}$ ;  $2.1 \cdot 10^{-5}$ ;  $6.5 \cdot 10^{-5}$  et  $16.1 \cdot 10^{-5}$  mU/mg de protéines.

Des activités AChE beaucoup plus faibles de  $0.3 \cdot 10^{-5}$ , de  $0.7 \cdot 10^{-5}$  et de  $0.6 \cdot 10^{-5}$  mU/mg de protéines ont été observées respectivement au niveau de la rate, des reins et de la peau avoisinant les fosses nasales.

Ayant mis en évidence l'activité AChE de la rosette olfactive de la carpe, nous avons voulu savoir si celle-ci existait également chez la truite et de manière aussi importante. Nous avons effectivement trouvé de l'acétylcholinestérase dans les rosettes olfactives de la truite; mais l'activité spécifique y était plus faible que chez la carpe. Elle s'élève en effet à  $3.5 \pm 0.5 \cdot 10^{-6}$  mU/mg de protéines.

#### 3.2. Inhibition "in vitro" de l'activité AChE

L'activité des AChEs a été inhibée in vitro par le DFP, le BW 284C51 et le carbofuran. L'observation des résultats concernant l'inhibition par le diisopropyl fluorophosphate a permis de montrer que les cholinestérases présentes dans tout le système olfactif sont semblables. On observe en effet une concentration inhibitrice de 50% de l'activité acétylcholinestérasique ( $CI_{50}$ ) de  $5.0 \cdot 10^{-5}$  M, de  $3.4 \cdot 10^{-5}$  M et de  $3.8 \cdot 10^{-5}$  M respectivement pour les rosettes, le bulbe et le cerveau.

L'utilisation du BW284C51, inhibiteur spécifique des AChEs, confirme ces résultats. On remarque que la  $CI_{50}$  est de  $7.5 \cdot 10^{-7}$  M et de  $7.8 \cdot 10^{-7}$  M respectivement pour le cerveau et les rosettes olfactives. Les courbes d'inhibition par le DFP et le BW284C51 sont monophasiques, ce qui indique que dans les échantillons de cerveau et de rosettes olfactives, l'activité mesurée est due exclusivement à une acétylcholinestérase (EC 3.1.1.7.) sans participation de butyrylcholinestérase (EC 3.1.1.8.). Le carbofuran provoque également une diminution de l'activité des acétylcholinestérases du système olfactif. La  $CI_{50}$  est de  $1.6 \cdot 10^{-9}$  M et de  $1.8 \cdot 10^{-6}$  M respectivement pour le cerveau et les rosettes.

#### 3.3. Inhibition "in vivo" de l'AChE par le carbofuran

Après 24 heures de baignation en présence du carbofuran à la dose de 5 ppb, on observe un taux d'inhibition de  $27.3 \pm 5.1\%$  dans les rosettes olfactives (figure 2). Par contre, les bulbes olfactifs et le cerveau ne sont pas aussi sensibles aux anticholinestérases; les taux d'inhibition sont respectivement de  $17.0 \pm 35\%$  et de  $15.7 \pm 4.2\%$ . Une diminution de l'activité AChE ( $24.2 \pm 1.1\%$ ) a été observée dans le foie. La rosette est en contact direct et permanent avec le milieu extérieur; celle-ci subirait plus rapidement l'effet des pesticides et serait un bon indicateur de la présence d'une pollution.

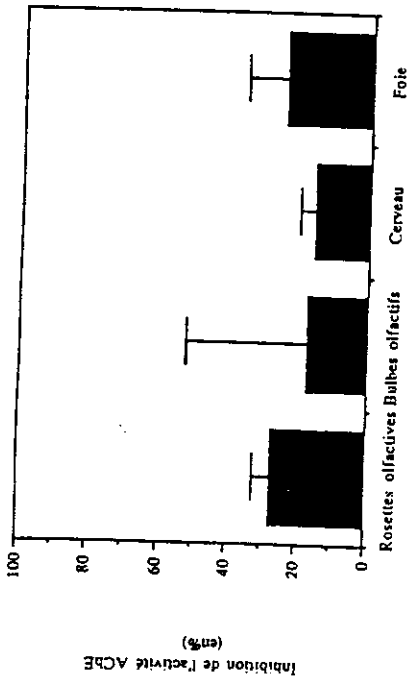


Figure 2: effet du carbofuran aux doses de 5 ppb sur l'activité de l'acétylcholinestérase de l'organe olfactif du cerveau et du foie de la carpe commune *Cyprinus carpio* après 24 heures

#### 4. Discussion

Dans le présent travail, nous avons caractérisé l'AChE présente en forte concentration dans le système olfactif de la carpe. Dans les rosettes olfactives, cette activité est cinq fois plus forte que chez la carpe que chez la truite par exemple. Ces différences pourraient tenir au mode de vie.

La présence d'acétylcholinestérase au sein de la rosette olfactive serait liée à la perception des odeurs. L'olfaction serait moins développée chez les espèces vivant dans les eaux à courant rapide et utilisant préférentiellement la vue pour la recherche de nourriture que chez celles qui vivent dans les eaux calmes où la luminosité est plus faible. Selon KOTKSCHAL et al. (1991), la structure du cerveau des Téléostéens reflète leur style de vie. En comparant la morphologie des cerveaux de Cyprinidés, il est possible de distinguer le type de comportement alimentaire et notamment le style de recherche de nourriture : par la vue ('sight feeders'), par le goût et l'olfaction ('mouth tasters') ou par un sens chimique lié à la peau ('skin tasters').

Les inhibitions *in vitro* et *in vivo* par le carbofuran ont montré que l'AChE des rosettes, des bulbes olfactifs et du cerveau de la carpe sont sensibles à l'action des carbamates. Cette sensibilité de l'AChE au carbofuran rend certainement compte des troubles de comportement observés aux plus fortes doses. CHAKRABORTY et al. (1989) ont également observé une diminution de l'activité acétylcholinestérasique de

95,39% au niveau de l'organe olfactif de *Heteropneustes fossilis* après une baignade de deux heures avec du parathion-méthyle. Ils ont remarqué que les poissons présentaient de nombreuses anomalies comportementales, des mouvements rapides suivis d'une immobilité létanique et un retard de l'ouverture des opercules. DUFFA et al. (1992) ont étudié la relation entre le comportement de la carpe indienne *Labeo rohita* et la concentration en malathion. Ils ont montré que cet insecticide anticholinergique à la dose de 1 ppm perturbe également les mouvements du poisson.

Le rôle de l'AChE dans les rosettes olfactives reste énigmatique. En effet, il n'a jamais été décrit de synapses cholinergiques au niveau des récepteurs sensoriels ou des terminaisons efférentes de la muqueuse olfactive. La présence d'AChE en dehors de tout contexte cholinergique n'est pas nouvelle y compris dans le système nerveux central (TOUITANT et MASSOULIE, 1988). Le rôle de ces formes d'AChE pourrait être un rôle d'hydrolyse de peptides auquel le système olfactif est très sensible. En effet, l'hydrolyse des peptides neuroactifs par l'AChE a déjà été mentionnée (TOUITANT et MASSOULIE, 1988) et le système olfactif est très sensible aux acides aminés L- (CAPRIO, 1988).

Nous essaierons dans l'avenir de préciser la localisation de l'AChE des rosettes olfactives par histochimie ou immunohistochimie et des lieux de synthèse par hybridation *in situ*. Nous évaluerons également l'impact de l'inhibition de l'AChE présente dans l'organe olfactif sur l'éthologie de la carpe commune.

#### Remerciements.

Nous remercions Messieurs J.-C. Gilson et C. Wonville pour les corrections apportées à ce manuscrit. Les recherches sont subsidiées par le Ministère de la Région Wallonne (convention n° 21253).

#### Références bibliographiques

- ADMIRAAL W., VAN DER VELDEG., SMIT H., CAZEMIER W. G. 1993 - The rivers Rhine and Meuse in the Netherlands : present state and signs of ecological recovery. *Hydrobiologia* 265, 97-128.
- BOCQUENÉ G., GALGANI F., BURGEOT T., LE DEAN L., TRUQUET P. 1993 - Acetylcholinesterase levels in marine organisms along french coasts. *Baseline*, 26(2), 101106.
- BRADFORD 1976 - A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 22, 248-258.
- CAPRIO J. 1988 - Peripheral filters and chemoreceptor cells in fishes. *In* : ATEMA R., FAY A.N., POPPER A.N., TAVOLGA W.N. *Sensory biology of aquatic animals*. Springer Verlag, New York, 248 p.
- CHAKRABORTY P.S., MALLIK A., DINGAL D.K., BANERJEE S. 1989 - Effect of methyl parathion on brain and olfactory organ acetylcholinesterase activity of the fish *Heteropneustes fossilis*. *Environment & Ecology*, 7, 310-314.

- DUTTA H.M., NASAR S.S.T., MUNSHI J.S.D., RICHMONDS C.R. 1992 - Malathion induced changes in the optomotor behavior of an indian carp, *Laheo rohita*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 49, 562-568.
- ELLMAN G.L., COURTNEY K.D., ANDRES V. et FEATHERSTONE R.M. 1961 - A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88-95.
- GALGANI F., BOCQUENE G., TRUQUET P., BURGEOT T., CHIFFOLEAU J.-F., CLAISSE D. 1992 - Monitoring of pollutant biochemical effects on marine organisms of French Coasts. *Oceanologica Acta*, 15, 355-364.
- HABIG C., DI GIULIO R.T. 1991 - Biochemical characteristics of cholinesterases in aquatic organisms. In : MINEAU P. *Cholinesterase-inhibiting insecticides. Their impact on wildlife and the environment*. Elsevier, Amsterdam, 348 p.
- KOTRSCHAL K., BRANDSTÄTTER R., GOMMAHR A., JUNGER H., PALZENBERGER M. ET ZAUNREITER M. 1991 - Brain and sensory systems. In: WINFIELD I.J., NELSON J.S. *Cyprinid Fishes. Systematics, biology and exploitation*. Chapman & Hall, London, 437 p.
- MASSOULIE J., BON S. 1982 - The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Ann. Rev. Neurosci.*, 5, 57-106.
- SAGLIO P. 1986 - Considérations sur le mécanisme chémosensoriel de la migration reproductrice chez les Salmonidés. *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, 301, 35-55.
- SCHERER E. 1975 - Avoidance of fenitrothion by goldfish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 13, 492-496.
- SCHUMACHER P.D., NEY J.J. 1980 - Avoidance response of rainbow trout to single dose chlorination in a power plant discharge canal. *Water Res.*, 14, 651-655.
- SUTTERLIN A.M. 1974 - Pollutants and the chemical senses of aquatic animals - perspective and review. *Chem. Senses Flavor*, 1, 167-178.
- SZABO A., NEMCSOK J., ASZTALOS B., RAKONCZAY Z., KASA P., LE HUU HIEU 1992 - The effects of pesticides on Carp (*Cyprinus carpio* L.). Acetylcholinesterase and its biochemical characterization. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 23, 39-45.
- TOUTANT J.-P. 1988 - Expression of asymmetric forms of acetylcholinesterase during myogenesis in vitro. *Reprod. Nutr. Develop.*, 28, 693-702.
- TOUTANT J.-P., MASSOULIÉ J. (1988) Vertebrates cholinesterases : tissues and cellular distribution of molecular forms and their physiological regulation. In : Whittaker V. *Handbook of Experimental Pharmacology* Vol. 86. Springer Verlag, Berlin, 355 p.
- WACHTLER K. 1988 - Phylogeny of cholinergic synapse. In : Whittaker V. *Handbook of Experimental Pharmacology* Vol. 86. Springer Verlag, Berlin, 57-80.