

**L'ACÉTYLCHOLINESTÉRISE DU SYSTÈME OLFACTIF
DE LA CARPE *CYPRINUS CARPIO* L.
(POISSONS, CYPRINIDAE): FORMES MOLÉCULAIRES
ET INHIBITION *IN VIVO* ET *IN VITRO*
PAR LE CARBOFURAN**

ERIC HAUBRUGE¹ ET JEAN-PIERRE TOUTANT²

¹Unité de Zoologie générale et appliquée, Faculté universitaire des Sciences agronomiques
de Gembloux, B-5030 Gembloux, Belgique

²Laboratoire de Différenciation Cellulaire et Croissance, INRA,
Montpellier, France

e-mail: zoologie@fsagx.ac.be

Résumé. L'utilisation des pesticides en agriculture et principalement dans la lutte contre les insectes est à la base d'importants problèmes écotoxicologiques du fait de leur longue rémanence dans l'environnement et de leur forte toxicité vis-à-vis des organismes aquatiques.

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 caractérisée dans les rosettes olfactives et le bulbe olfactif de la carpe commune *Cyprinus carpio*. Des formes moléculaires globulaires d'AChE sont présentes dans tout l'organe olfactif et des formes asymétriques ont été mises en évidence dans les rosettes olfactives. Au niveau de cet organe, l'AChE 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 des concentrations sublétales de carbofuran montre une inhibition de l'activité AChE de $33,4 \pm 5,1$ %; de $49,3 \pm 2,7$ % et de $45,8 \pm 2,6$ % respectivement pour les rosettes, le bulbe olfactif et le cerveau après 48 heures.

Acetylcholinesterase, in the olfactory organ of the common carp *Cyprinus carpio* (Teleost, Cyprinidae): characterization of molecular forms *in vitro* and *in vivo* inhibition by carbofuran

Abstract. The use of pesticides in agriculture and in insect control has been creating a potential danger to aquatic life and human health. 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 native molecular forms of AChE present in olfactory organ have been characterized by sedimentation analysis in sucrose gradients. AChE exists as globular and asymmetric forms. The reduction of olfactory organ AChE activity is already perceptible at sublethal concentrations of carbofuran. The results show an inhibition of olfactory organ AChE ranging from 33,4% to 49,3% after 48 hours. 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.

Mots-clés : acétylcholinestérases, système olfactif, carbofuran, biomarqueur d'exposition, *Cyprinus carpio*.

INTRODUCTION

Abréviations :

acétylcholinestérase(s) = AChE(s);
cholinestérase(s) = ChE(s);
acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque = DTNB;
Phosphate Buffer = PB.

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 & NEY, 1980; 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 (HgCl₂) à la concentration 10⁻⁴ M pendant 10 secondes suffit pour inhiber la sensibilité olfactive de *Oncorhynchus gorbuscha* Walbaum, aux acides aminés pendant plus d'une heure (SUTTERLIN, 1974).

L'organe olfactif, présent sur le bord antérieur de l'oeil 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 3.1.17.) a été largement étudiée et utilisée pour mesurer l'impact des organophosphorés et des carbamates sur le milieu aquatique (HABIG & DI GIULIO, 1991; SZABO *et al.*, 1992; BOCQUENÉ *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 (MASSOULIÉ & BON, 1982) et des invertébrés, à l'exception des formes très primitives (WÄCHTLER, 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 et la caractérisation de l'AChE dans les rosettes, les bulbes olfactifs de la carpe commune ainsi que l'étude des formes moléculaires et de l'impact de micropolluants à action anticholinergique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Prélèvement des rosettes, des bulbes olfactifs et du cerveau

Les carpes (*Cyprinus carpio* L.) ont été élevées à la station expérimentale de pisciculture 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 moelle épinière à l'arrière de la tête. La 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 située 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.

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.

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 MgCl₂; 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 acétylcholinestérasés.

Dosage des protéines

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

Dosage des acétylcholinestérasés

Les acétylcholinestérasés ont été dosés 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'iodure 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. L'activité spécifique est ensuite calculée selon la méthode de ZINKL, *et al.* (1991).

Inhibition *in vitro* de l'activité des cholinestérasés

L'effet de trois inhibiteurs: le diisopropyl fluorophosphate (DFP), le BW (Burrows Wellcome) 284C51 (bis [4-allyldiméthyl-ammoniumphényl]pentan-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 μ l de l'inhibiteur choisi ont été ajoutés après le DTNB et le tampon phosphate PB.

Centrifugation au moyen de gradients de saccharose

Pour l'analyse précise du polymorphisme moléculaire de l'AChE et l'identification de certaines formes minoritaires, des extractions successives ont été réalisées (MASSOULIÉ & BON, 1980): l'échantillon est tout d'abord homogénéisé dans un milieu LS (pour «Low-Salt»; 50 mM $MgCl_2$; EDTA 1mM; 10 mM Tris-HCl pH 7,0; 0,1 mg/ml bacitracine). Après une centrifugation de 15 mn à 18.000 g et à 4°C, le culot est repris dans un tampon LST (pour «Low-Salt Triton»; 50 mM $MgCl_2$; EDTA 1mM; 10 mM Tris-HCl pH 7,0; 1% de Triton X-100; 0,1 mg/ml bacitracine) et après une nouvelle centrifugation dans le milieu HS (pour «High Salt»; 1M NaCl; 50 mM $MgCl_2$; EDTA 1mM; 10 mM Tris-HCl pH 7,0; 0,1 mg/ml bacitracine). Les extraits obtenus sont, dans l'ordre, les fractions LSS («Low-Salt Soluble» dans le milieu LS), DS («Detergent Soluble» dans le tampon LST) et HSS («High Soluble Soluble» dans le milieu HS). Cent cinquante microlitres d'extrait sont déposés au sommet d'une solution de gradient de saccharose (5%-20%) dans un tampon HST (1M NaCl; 50 mM $MgCl_2$; EDTA 1mM; 10 mM Tris-HCl pH 7,0; 1% de Triton X-100; 0,1 mg/ml bacitracine) ou dans un tampon HS. La centrifugation est réalisée à 6°C sur un rotor Beckman SW41 pendant 16 h à 200.000 g. La phosphatase alcaline (6,1 S) et la b-galactosidase (16S) sont incorporées dans la solution de gradient de saccharose comme standards du point de sédimentation. L'activité des cholinestérases totales de chacune des fractions collectées est ensuite mesurée. Dans certains cas, nous avons procédé à une extraction unique dans HST (les trois fractions des extractions séquentielles sont solubilisées en même temps). Les extraits sont analysés sur des gradients HST ou HS comme précédemment. De telles extractions donnent une idée des proportions de chacune des formes moléculaires dans le tissu.

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 ± 2 °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 50 ppb tandis qu'un autre d'une même contenance d'eau sert de témoin. Quinze carpes sont placées dans chaque bassin. Tous les deux jours, l'eau est renouvelée. Après une semaine, les carpes sont sacrifiées et disséquées. L'activité des acétylcholinestérases présentes dans le système olfactif est ensuite mesurée.

Un lot de 15 carpes a également été mis en balnéation à la dose de 10 ppb en carbofuran. Quinze autres carpes ont été placées dans un autre bac ne contenant pas de carbofuran. Après 48 heures, les poissons sont sacrifiés pour extraire les rosettes, les bulbes olfactifs et le cerveau. L'activité des acétylcholinestérases présentes dans le système olfactif est ensuite mesurée.

RÉSULTATS

Activité acétylcholinestérasique dans le système olfactif

L'activité acétylcholinestérasique présente dans les différentes parties du système olfactif de la carpe est montrée à la Fig. 1 en comparaison avec la peau et le cerveau.

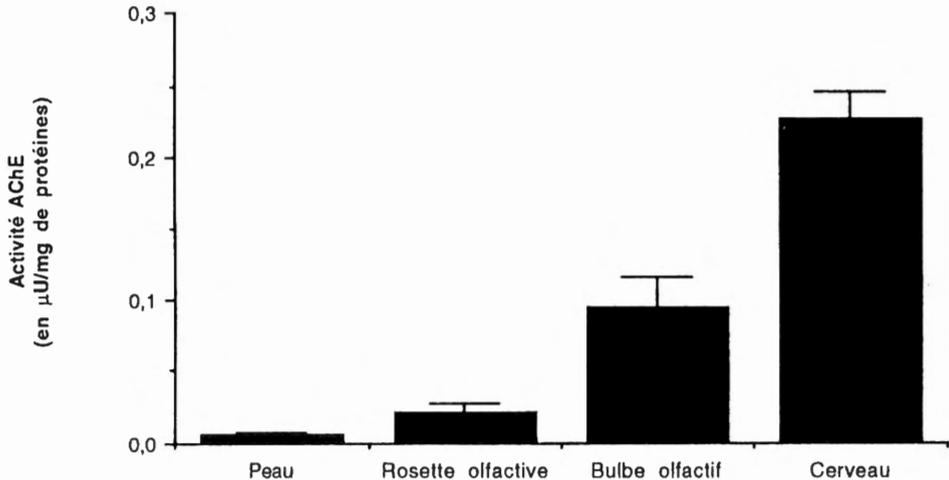


Fig. 1. — Activité acétylcholinestérasique (moyenne \pm écart-type) présente dans l'organe olfactif et le cerveau de la carpe commune *Cyprinus carpio* à 25°C pendant une minute. Vingt poissons ont été utilisés pour l'expérimentation.

Les rosettes olfactives présentent une activité AChE de $2,2 \cdot 10^{-5}$ mU/mg de protéines alors que l'activité AChE dans le cerveau est de $22,8 \cdot 10^{-5}$ mU/mg de protéines. Les bulbes possèdent une activité AChE de $9,5 \cdot 10^{-5}$ mU/mg de protéines. Une activité AChE plus faible de $0,6 \cdot 10^{-5}$ mU/mg de protéines a été observée au niveau 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.

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 cholinestérasés 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 (Fig. 2).

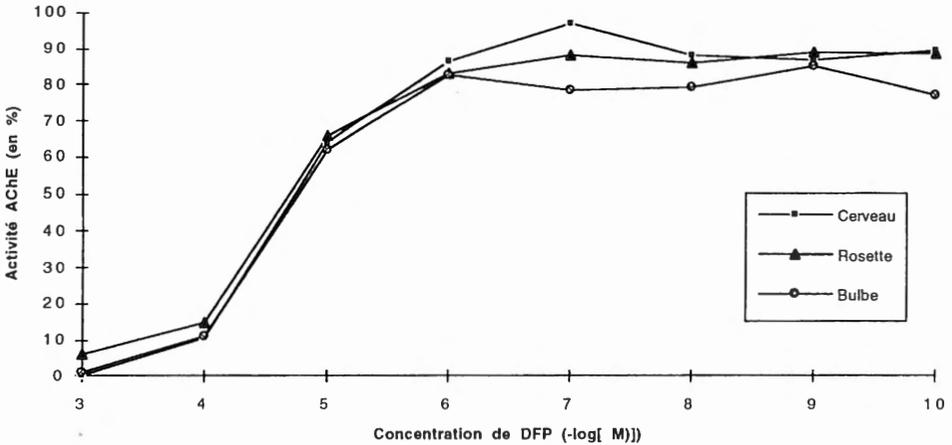


Fig. 2. – Inhibition de l'activité acétylcholinestérasique présente dans l'organe olfactif de la carpe commune *Cyprinus carpio* par le DFP. L'inhibition de l'AChE extraite du cerveau est montrée par comparaison.

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 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 $1,6 \cdot 10^{-6}$ M et de $1,8 \cdot 10^{-6}$ M respectivement pour le cerveau et les rosettes.

Les formes moléculaires de l'AChE du système olfactif

La Fig. 3a montre les profils de sédimentation d'un extrait direct de rosettes effectué dans un tampon HST centrifugé soit sur un gradient HST soit sur un gradient HS. Par analogie aux résultats obtenus sur l'AChE d'autres vertébrés, on identifie les deux formes globulaires prédominantes comme les formes G1 (monomériques) et G4 (tétramériques) avec un épaulement vers 7S correspondant aux formes G2 (dimériques). Une faible quantité de formes asymétriques A12 est détectable vers 17-18S.

L'analyse des fractions successives LSS, DS et HSS (Fig. 3 b et c) confirme les résultats obtenus avec l'extrait direct : formes G1, G2 et G4 dans les fractions LSS et DS. Ce

type d'extractions successives permet la détection plus facile des formes A12 dans la fraction HSS seulement (Fig. 3c). Les profils obtenus sont très comparables à ceux des bulbes olfactifs et du reste du cerveau.

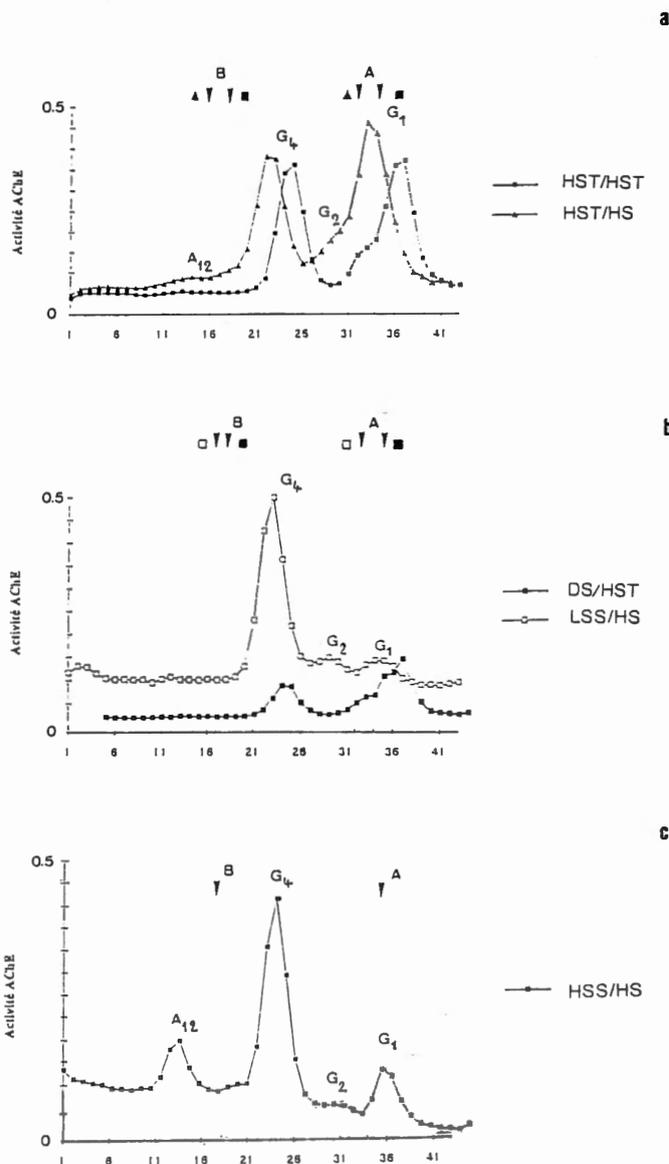


Fig. 3. - Analyse des formes moléculaires de l'acétylcholinestérase présente dans les rosettes olfactives de la carpe commune *Cyprinus carpio*. Les formes moléculaires ont été extraites au moyen de tampon HST (a, extrait direct), ou de façon séquentielle dans des tampons LS puis LST (en b), puis HS (en c) donnant les fractions LSS, DS et HSS. L'activité acétylcholinestérasique est exprimée en $\Delta A_{412} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$. A = phosphatase alcaline (6,1 S); B = E. coli β -galactosidase (16 S).

Inhibition *in vivo* de l'AChE du système olfactif par le carbofuran

Balnéation de carpes à la dose de 50 ppb en carbofuran

Un premier essai a été entrepris. Il visait à mettre en évidence l'effet d'inhibition d'un micropolluant anticholinestérasique sur l'organe olfactif de la carpe. Le choix s'est porté sur une dose relativement élevée en toxique de façon à être certain que la concentration en inhibiteur soit suffisante pour provoquer une inhibition importante de l'AChE.

Il est important de signaler que la mortalité s'élève à 4 individus dans le bassin contenant le carbofuran et que les autres poissons souffraient de troubles moteurs graves comme des convulsions ou de la tétanie. Le taux d'inhibition de l'activité AChE dans le cerveau ($83,1 \pm 1,3 \%$), peut expliquer la mortalité observée (Fig. 4).

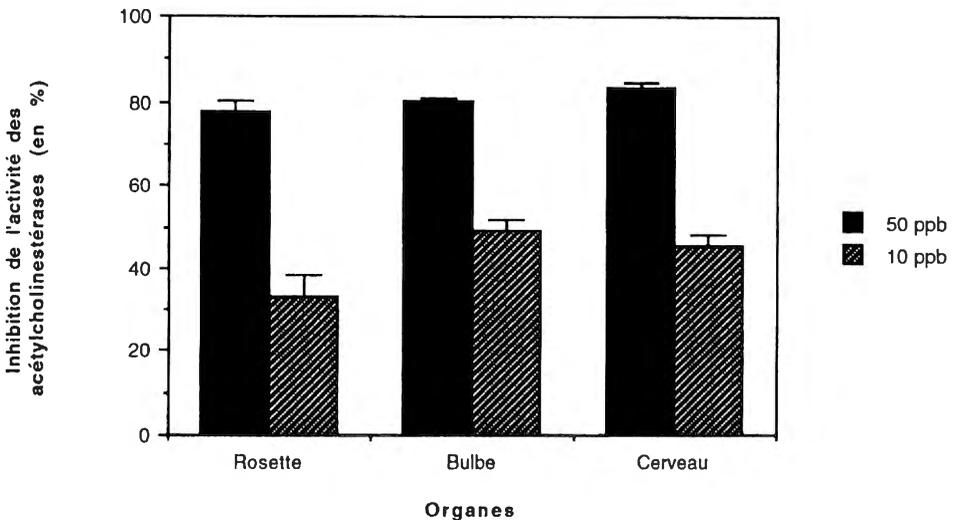


Fig. 4. – Effet du carbofuran aux doses de 10 et 50 ppb sur l'activité de l'acétylcholinestérase de l'organe olfactif et du cerveau de la carpe commune *Cyprinus carpio* après 48 heures.

On observe également un taux d'inhibition de $77,7 \pm 2,8 \%$ et de $80,5 \pm 0,4 \%$ respectivement dans les rosettes et le bulbe olfactif (Fig. 4). Les différents organes du système olfactif sont aussi sensibles aux anticholinestérasiques que le cerveau. Puisque la rosette est en contact direct et permanent avec le milieu extérieur, celle-ci subirait davantage l'effet des pesticides et serait un meilleur indicateur de la présence d'une pollution.

Balnéation de carpes à la dose de 10 ppb en carbofuran

Après 48 heures de balnéation en présence du carbofuran à la dose de 10 ppb, une diminution de l'activité AChE a été observée dans tous les organes olfactifs. En effet, les

taux d'inhibition de $33,4 \pm 5,1$ % ; $49,3 \pm 2,7$ % et $45,8 \pm 2,6$ % ont été observés respectivement pour les rosettes, le bulbe olfactif et le cerveau (Fig. 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 chez la carpe que chez la truite par exemple. Ces différences pourraient avoir un rapport avec le 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 vivant dans les eaux calmes où la luminosité est plus faible. Selon KOTRSCHAL *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 observé une diminution de l'activité acétylcholinestérasique de 95,39% au niveau de l'organe olfactif de *Heteropneustes fossilis* (Bloch) 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 tétanique et un retard de l'ouverture des opercules. DUTTA *et al.* (1992) ont étudié la relation entre le comportement de la carpe indienne *Labeo rohita* (Haming Buchen) et la concentration en malathion. Ils ont montré que cet insecticide anticholinergique à la dose de 1 ppm perturbe également les mouvements du poisson.

Les formes moléculaires de l'AChE des rosettes olfactives ont été étudiées en comparaison avec celles détectées dans les bulbes olfactifs ou dans le reste du cerveau. Nous avons identifié les formes majoritaires G1 et G4 ainsi que des quantités plus faibles de formes dimériques G2. Des expériences préliminaires d'interaction avec les détergents non dénaturants nous ont montré qu'une partie au moins de ces formes est sans doute amphiphile indiquant qu'elles sont associées, *in situ*, à la membrane plasmique. Des études complémentaires sont toutefois encore nécessaires pour déterminer la nature exacte du domaine hydrophobe des molécules amphiphiles. Les formes globulaires représentent la très grande majorité de l'activité AChE des rosettes puisque les formes asymétriques sont à peine détectables dans un extrait direct (HST, Fig. 3a). Le recours aux extractions séquentielles permet cependant d'identifier sans ambiguïté la forme A12 dans l'extrait HS (Fig. 3c).

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 de formes globulaires d'AChE en dehors de tout contexte cholinergique n'est pas nouvelle y compris dans le système nerveux central (TOUTANT & MASSOULIÉ, 1988). Le rôle de ces formes d'AChE pourrait être un rôle d'hydrolyse de peptides auxquels le système olfactif est très sensible. En effet, l'hydrolyse des peptides neuroactifs par l'AChE a déjà été mentionnée (TOUTANT & MASSOULIÉ, 1988) et le système olfactif est très sensible aux acides aminés L- (CAPRIO, 1988). En revanche, la présence de formes asymétriques est considérée jusqu'à présent comme l'indice d'une innervation cholinergique si l'on excepte le cas des cellules musculaires différenciées *in vivo* et *in vitro* (Toutant, 1988). La présence de formes asymétriques dans les rosettes olfactives pose donc un problème intéressant; la contamination lors de la dissection des rosettes olfactives par des débris de bulbes (comportant des voies cholinergiques et apportant les formes asymétriques) pouvant être exclue. Il est à noter que les Téléostéens possèdent souvent des proportions très élevées de formes asymétriques (plus de 50% de l'activité totale AChE chez *Danio rerio* ou *Esox lucius*, observations non publiées) sans que l'on sache pour l'instant si celles-ci sont toujours localisées aux voies cholinergiques.

Nous essayerons, 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*.

REMERCIEMENTS

Nos remerciements vont à Messieurs B. De Bast et B. Domange pour l'aide apportée dans la réalisation scientifique de ce travail ainsi que Messieurs J.-C. Gilson et C. Wonville pour la lecture du manuscrit. Les recherches sont subsidiées par le Ministère de la Région Wallonne (convention n° 21253).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADMIRAAL, W., G. VAN DER VELDE, H. SMIT & W. G. CAZEMIER (1993) – The rivers Rhine and Meuse in the Netherlands: present state and signs of ecological recovery. *Hydrobiologia*, **265**:97-128.
- BOCQUENÉ, G., F. GALGANI, T. BURGEOT, L. LE DEAN & P. TRUQUET (1993) – Acetylcholinesterase levels in marine organisms along french coasts. *Baseline*, **26**(2):101-106.
- 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: *Sensory biology of aquatic animals*, ATEMA R., A.N. FAY, A.N. POPPER & W.N. TAVOLGA (eds). Springer Verlag, New York, 248 pp.
- CHAKRABORTY, P.S., A. MALLIK, D.K. DINGAL & S. BANERJEE (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., S.S.T. NASAR, J.S.D. MUNSHI & C.R. RICHMONDS (1992) – Malathion induced changes in the optomotor behavior of an indian carp, Laheo rohita. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **49**: 562-568.
- ELLMAN, G.L., K.D. COURTNEY, V. ANDRES & R.M. FEATHERSTONE (1961) – A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, **7**: 88-95.
- GALGANI, F., G. BOCQUENE, P. TRUQUET, T. BURGEOT, J.-F. CHIFFOLEAU & D. CLAISSE (1992) – Monitoring of pollutant biochemical effects on marine organisms of French Coasts. *Oceanologica Acta*, **15**: 355-364.
- HABIG, C. & R.T. DI GIULIO (1991) – Biochemical characteristics of cholinesterases in aquatic organisms. In: *Cholinesterase-inhibiting insecticides. Their impact on wildlife and the environment*. MINEAU P. (ed). Elsevier, Amsterdam: 19-34.
- HARA T.J. (1986) – Role of olfaction in fish behaviour. In: *The behaviour of teleost fishes*. PITCHER T.J. (ed). Croom Helm, London & Sidney: 185-197.
- KOTRSCHAL, K., R. BRANDSTÄTTER, A. GOMHR, H. JUNGER, M. PALZENBERGER & M. ZAUNREITER (1991) – Brain and sensory systems. In: *Cyprinid Fishes. Systematics, biology and exploitation*. WINFIELD I.J. and NELSON J.S. (eds). Chapman & Hall, London: 45-63.
- MASSOULIÉ, J. & S. BON (1982) – The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Ann. Rev. Neurosci.*, **5**: 57-106.
- MASSOULIÉ, J. & J.-P. TOUTANT (1988) – Vertebrates cholinesterases: structures and types of interaction. In: *Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 86*. V.P. WHITTAKER (ed). Springer Verlag, Berlin: 225-265.
- 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. & J.J. NEY, (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., J. NEMCSOK, B. ASZTALOS, Z. RAKONCZAY, P. KASA & 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. & J. MASSOULIÉ (1988) – Vertebrates cholinesterases: tissues and cellular distribution of molecular forms and their physiological regulation. In: *Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 86*. WHITTAKER V. (ed). Springer Verlag, Berlin, 355 p.
- WÄCHTLER, K. (1988) – Phylogeny of cholinergic synapse. In: *Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 86*. WHITTAKER V.P. (ed.). Springer Verlag, Berlin: 57-80.
- ZINKL, J.G., W.L. LOCKHART, S.A. KENNY & F.L. WARD (1991) – The effects of cholinesterase inhibiting insecticides on fish. In: *Cholinesterase-inhibiting insecticides. Their impact on wildlife and the environment*. MINEAU (ed.) Elsevier, Amsterdam: 233-254.