

## Niveau de l'acétylcholinestérase chez quatre espèces de poissons de l'estuaire du Sebou

Ouafae BENKIRANE <sup>1</sup>, Naïma SAIDI <sup>1</sup> & Mohammed Khalid CHOULLI <sup>2</sup>

(Reçu le 29/05/2000 ; Accepté le 23/02/2001)

### معايرة النشاط الاستيلكولينسترازي عند أربعة أنواع من السمك العظمي في مصب نهر سبو

إن الفوسفورات العضوية و الكاربامات مبيدات من أصل فلاحى معروفة بمفعولها المسمم للجهاز العصبى، ذلك لأنها قادرة على منح الكولينستراز و خاصة الاستيلكولينستراز، فهي تحتل الموقع الطبيعى للكولينستراز مما يؤدي إلى تراكم الكولين في نقطة الإشتباك العصبى فيسبب الشلل ثم بعد ذلك الموت. في محاولة لمعرفة درجة إعداد مصب نهر سبو بالمبيدات السابقة الذكر، تمت معايرة النشاط الكولينسترازي عند أربعة أنواع من السمك العظمي . تمت المعايرة في كل من العضلة، الدماغ، الكبد و الغلصمة. هكذا أخذت عينات من هذه الأعضاء خلال شهر يونيو و دجنبر من سنة 1998 في موقعين، مصب نهر سبو و مهدية ومن خلال هذه الدراسة تبين تغير النشاط الاستيلكولينسترازي بين الموقعين مما قد يدل على وجود مفعول مسمم للجهاز العصبى ناتج عن تواجد الفوسفورات العضوية و الكاربامات في نهر سبو.

**الكلمات المفتاحية :** أستيلكولينستراز - الفوسفورات العضوية - الكاربامات - سوليفيلكاريس - ديسونتراكوس لابراكس - ديبلوديس ساركيس - بلورونكتس بلاتسا

### Niveau de l'acétylcholinestérase chez quatre espèces de poissons de l'estuaire du Sebou

Les organophosphorés (OP) et les carbamates (C), insecticides d'origine agricole, sont toxiques pour la plupart des organismes en raison de leur faculté d'inhibition des cholinestérases et plus particulièrement l'acétylcholinestérase (AChE). En effet, ils provoquent une accumulation des cholines au niveau des synapses, aboutissant à la paralysie puis à la mort. Afin de détecter une contamination de l'estuaire de l'Oued Sebou par ces insecticides, l'activité acétylcholinestérasique (AChE) a été dosée dans le muscle, le cerveau, le foie et les branchies de quatre poissons : *Solea vulgaris* (sole), *Dicentrachus labrax* (loup), *Diplodus sargus* (sar) et *Pleuronectes platessa* (plie). Les échantillons prélevés semestriellement dans l'estuaire de l'Oued Sebou présentent une plus faible activité AChE par rapport à celle des espèces du site témoin (large de Mehdy). Cette différence de l'activité AChE entre les deux sites, attribuée aux effets neurotoxiques liés à la présence dans le milieu d'OP ou de C, signifierait une contamination de l'estuaire de l'Oued Sebou.

**Mots clés :** Acétylcholinestérase - Organophosphorés - Carbamates - Poisson - *Solea vulgaris* - *Dicentrachus labrax* - *Diplodus sargus* - *Pleuronectes platessa* - Sebou - Maroc

### Level of acetylcholinesterase activity in four fish species from Sebou estuary

The organophosphorous (OP) and the carbamates (C) are insecticides of agricultural origine. They are known for their neurotoxicity to majority of the animals by their capacity to inactivate the cholinesterase (ChEs) and particularly the acetylcholinesterase (AChE). They cause an accumulation of cholines on the level of the synapses, leading to the paralyse then to the death. To detect a potential contamination of the Sebou estuary by the OP and C, the AChE activity were measured for four teleosteen species : *Solea vulgaris*, *Dicentrachus labrax*, *Diplodus sargus* and *Pleuronectes platessa* on the muscle, the brain, the liver and the branchies. Semi-annual taking away were carried out in june and december 98. The acetylcholinesterase activity in four fish from Sebou estuary was compared to the activity mesured in animals witness from the open sea of Mehdy (control). This study highlights decreasing of the AChE activity for the estuary species. That could indicate neurotoxic effects related to the presence in the medium of OP or C.

**Key words :** Acetylcholinesterase - Organophosphorous - Carbamates - Fish - *Solea vulgaris* - *Dicentrachus labrax* - *Diplodus sargus* - *Pleuronectes platessa* - Sebou - Morocco

<sup>1</sup> Laboratoire d'Écotoxicologie et de Parasitologie Marine, Université Ibn Tofail, Faculté des Sciences, Kénitra

<sup>2</sup> Laboratoire de Pharmacologie et d'Essais Biologiques, Université Ibn Tofail, Faculté des Sciences, Kénitra, Maroc

<sup>□</sup> Auteure correspondante, e-courrier : ouafae.benkirane@caramail.com

## INTRODUCTION

L'Oued Sebou et ses affluents drainent une superficie de 34000 km<sup>2</sup>. Il s'étend sur plus de 600 km en prenant naissance dans le Moyen Atlas sous l'appellation de Oued Guigou. Il débouche dans l'Atlantique, par l'intermédiaire de son estuaire de 35 km de longueur, la remontée d'eaux marines étant arrêtée au niveau du barrage de Garde, en aval immédiat de Sidi Allal Tazi. Ce fleuve est le siège de nombreux déversements de polluants qui proviennent de diverses origines. En effet, ce site est soumis à de fortes influences anthropiques dues à une importante activité industrielle (tanneries, papeteries, huileries, sucreries, conserveries), urbaine (forte densité de la population) et agricole (le Sebou traverse une des premières régions agricoles au Maroc). De ce fait, les organismes aquatiques sont continuellement en contact avec de multiples substances comme les hydrocarbures, les pesticides et les métaux lourds. Eu égard aux interactions entre ces , il est très difficile d'évaluer l'effet de chacun d'entre eux. En outre, la capacité naturelle des zones côtières à disperser et assimiler ces n'étant pas illimitée, la préservation de la qualité des eaux ne peut être assurée que par un contrôle rigoureux des rejets polluants.

Afin d'amorcer une surveillance, on a choisi de doser un bio-indicateur de pollution, l'acétylcholinestérase. En effet, les informations apportées par un bio-indicateur sont généralement complémentaires des mesures relevées par les chimistes de l'environnement. Parfois, elles s'y substituent lorsque l'analyse chimique se révèle difficile ou coûteuse, ce qui est le cas de nombreuses molécules organiques instables ou présentant une grande diversité moléculaire. Dans ce cas, la spécificité de la réponse biologique permet à la fois d'appréhender les effets sublétaux et les mécanismes perturbés, mais aussi de détecter la présence de polluants dans le milieu.

L'inhibition des cholinestérases par les organophosphorés (OP) et les carbamates (C) fournit un bio-indicateur très utilisé actuellement (Galgani *et al.*, 1992 ; Payne *et al.*, 1994 ; Coppage *et al.*, 1976 ; Zinckel *et al.*, 1987 ; Olson & Christensen, 1980). En hydrolysant les esters de la choline (neuromédiateurs), l'enzyme (neurotransmetteur) assure la transmission de l'influx nerveux au niveau des synapses des jonctions neuromusculaires et interneurales.

Les OP et C possèdent des dégradabilités hétérogènes et des demi-vies de plusieurs mois en milieu marin bien que de structures moléculaires différentes et qu'ils n'aient pas la rémanence des organochlorés. Ainsi, le parathion présente une demi-vie de 7 mois en milieu estuarien (Weber, 1976). Les données chimiques sur les niveaux de contamination des différents compartiments marins par ces molécules sont rares (Barcelo *et al.*, 1991), la difficulté analytique étant la cause. Le recours à l'AChE pour l'identification des effets des OP et C sur les espèces aquatiques (Weiss *et al.*, 1990 ; Day & Scott, 1990) nécessite de disposer d'espèces sentinelles ou bio-indicatrices capturées dans le milieu.

L'objectif de ce travail est la recherche d'éventuelles perturbations de l'acétylcholinestérase par les organophosphorés et les carbamates.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### • Préparation des échantillons

Quatre espèces de téléostéens [*Solea vulgaris* (sole), *Dicentrarchus labrax* (loup), *Diplodus sargus* (sar) et *Pleuronectes platessa* (plie)] ont été retenues en raison de leur capacité à peupler le milieu marin et estuarien, de leur intérêt commercial et de leur contact avec le sédiment dans le cas de la plie et de la sole.

Ces quatre espèces ont été pêchées au niveau de l'estuaire de l'Oued Sebou, site subissant l'influence des apports de tout le fleuve. À titre comparatif, des spécimens de deux espèces témoins (la sole et le loup de mer) ont été prélevés sur le site littoral ouvert de Mehdyia. Ces spécimens ont été pêchés à la ligne et directement acheminés vers le laboratoire. Pour chaque espèce, dix échantillons de taille homogène ont été récoltés.

Les différents organes des poissons (cerveau, muscle, branchies et foie) ont été prélevés, coupés en petits fragments, puis broyés dans du tampon Tris 0,1 à pH 8 à 4°C. Les extraits ont été ensuite centrifugés à 9000 g pendant 20 minutes.

### • Dosage de l'activité spécifique

La méthode de Bradford (1976) a été utilisée pour la détermination quantitative des protéines.

L'activité acétylcholinestérasique des extraits a été mesurée d'après la méthode d'Ellman *et al.* (1961). La variation d'une unité d'absorbance

correspond à l'hydrolyse de 75 nanomoles de substrat à 25°C et à pH 8. L'activité spécifique AchE est exprimée en micromoles de thiocholine libérées par minute et par mg de protéines.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Le dosage des protéines totales et de l'activité AChE a été effectué chez les quatre espèces de poissons comme décrit dans matériel et méthodes. Les valeurs données dans les tableaux 1, 2, 3 & 4 sont la moyenne des mesures effectuées sur chaque organe.

**Tableau 1. Activité spécifique\* AChE (juin 1998) chez quatre espèces de poisson pêchées dans l'estuaire du Sebou**

	Plie	Sole	Sar	Loup
Muscle	784	432	825	920
Cerveau	432	290	895	855
Foie	216	225	529	651
Branchies	85	115	358	317

\* L'activité spécifique est exprimée en  $\mu$ moles TCh/mn.mg

**Tableau 2. Activité spécifique AChE (juin 1998) chez deux espèces de poisson pêchées à Mehdy (témoin)**

	Plie	Sole
Muscle	608	1228
Cerveau	429	995
Foie	280	340
Branchies	225	299

**Tableau 3. Activité spécifique AchE (décembre 1998) chez quatre espèces de poisson pêchées dans l'estuaire du Sebou**

	Plie	Sole	Sar	Loup
Muscle	846	387	918	985
Cerveau	508	310	928	892
Foie	266	295	610	710
Branchies	152	231	284	375

**Tableau 4. Activité spécifique AchE (décembre 1998) chez deux espèces de poisson pêchées à Mehdy (témoin)**

	Plie	Sole
Muscle	656	1165
Cerveau	398	933
Foie	321	425
Branchies	210	260

Ces résultats montrent, pour tous les poissons, que les plus fortes activités AchE sont observées dans le muscle et le cerveau par rapport au foie et aux branchies. L'AChE étant impliquée dans la transmission de l'influx nerveux, il n'est pas étonnant que cette enzyme soit localisée principalement dans ces deux tissus. L'activité acétylcholinestérasique reste cependant plus élevée dans le muscle, chez le loup (920) et le sar (825) par rapport à la plie (784) et à la sole (432). Cela témoigne d'une nette variation inter-espèce probablement liée au fait que la plie et la sole, poissons plats, restent très proches du sédiment. Cette proximité favoriserait alors l'imprégnation des tissus de l'animal par les OP et les C.

Par ailleurs, les poissons provenant de l'estuaire (Tableaux 1 et 3) présentent des activités spécifiques AChE plus faibles que celles mesurées sur les poissons témoins du site de Mehdy (Tableaux 2 et 4). Cette variation entre les deux sites pourrait être attribuée à une inhibition due à la contamination de l'estuaire du Sebou par tous les apports polluants d'amont en aval. En effet, l'estuaire étant moins balayé par les courants que l'embouchure, l'accumulation des polluants y est plus facile.

En outre, les activités AChE dosées chez tous les poissons estuariens révèlent une légère baisse en juin. Cela suggère l'enrichissement des eaux du fleuve et de ses sédiments par différents polluants. Ces derniers, notamment les insecticides OP et C, proviendraient du lessivage des sols après la saison agricole.

Cette chute de l'AChE serait également due à une synergie d'effet des OP et C (Bocquené *et al.*, 1995): l'effet inhibiteur de l'association organophosphorés-carbamates sur les cholinestérases est plus fort que l'addition des effets de chacun des composés séparément. Dans les milieux naturels, les organismes sont soumis à de nombreux mélanges complexes de polluants en particulier lorsque les formulations d'insecticides mettent en jeu plusieurs matières actives.

D'autre part, la présence de polluants comme certains métaux, notamment le chlorure de zinc et le chlorure mercurique, pourrait renforcer les effets inhibiteurs des OP et C (Bocquené & Galgani, 1991; Bocquené *et al.*, 1995). Certains travaux (Bennasser, 1997; Bouachrine, 1996; Maarouf *et al.*, 1994) ont même mis en évidence la présence de

métaux lourds à des teneurs élevées dans l'estuaire du Sebou. Cela pourrait également expliquer l'écart des activités AChE entre les deux sites étudiés.

## CONCLUSION

Cette étude montre que les activités cholinestérasiques, chez les poissons de l'estuaire, particulièrement chez les espèces vivant près du sédiment (sole et plie), sont plus faibles que celles des espèces témoins pêchés à Mehdyia. Cette baisse du niveau serait due à l'inhibition de l'AChE chez les spécimens de l'estuaire par des organophosphorés et carbamates.

En effet, il existe une corrélation entre l'activité acétylcholinestérasique des tissus des poissons étudiés et la contamination globale du milieu par les OP et C. Les niveaux d'activité de cette enzyme sont inversement proportionnels à l'intensité de la pollution. Néanmoins, un suivi à long terme de cette activité et une connaissance plus approfondie des caractéristiques chimiques concernant les degrés de contamination des différents compartiments du milieu marin permettraient de confirmer ces résultats.

## RÉFÉRENCES CITÉES

- Barcelo D., Sole M., Durand G. & Albaiges J. (1991) Analysis and behaviour of organophosphorous pesticides in a rice crop field. *Fresenius J. Anal. Chem.* (339) : 676-683
- Bennasser L. (1997) Diagnose de l'état de l'environnement dans la plaine du Gharb : suivi de la macropollution et son incidence sur la qualité hydrochimique et biologique du bas Sebou. Thèse Doctorat d'état. Université Ibn Tofaïl, Kénitra
- Bocquené G. (1997) Activités cholinestérasiques de coquilles Saint-Jacques et de pétoncles de la Rade de Brest : Recherches des effets des insecticides organophosphorés et carbamates. *Ann. Inst. Océanogr.* (Paris) 73 (1) : 59-68
- Bocquené G., Bellanger C., Cadiou Y. & Galgani F. (1995) Joint action of combinations on the acetylcholinesterase activity of several marine species. *Ecotoxicology*. 4 (3) : 226-279
- Bouachrine M. (1996) Étude de la contamination métallique d'un cours d'eau marocain, cas du bas Sebou. Thèse de 3<sup>ème</sup> cycle, Faculté des Sciences. Kénitra.
- Bradford M. (1976) A rapid and sensitive assay of protein utilizing the principle of binding. *Analyt Biochem.* 772 : 248-264
- Coppage D.L. & Braidecht E. (1976) River pollution by anti cholinesterase agents. *Water Res.* 10 : 19-24
- Day K.E. & Scott I.M. (1990) Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentration of organophosphate insecticides. *Aquatic Toxicol.* 18 : 101-114
- 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
- Galgani F., Bocquené G. & Cadiou (1992) : Evidence of variation in cholinesterase activity in fish along gradient in the north sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 91 (1 à 3) : 77-82
- Maarouf A., Mazlani S., Pihan J-C. & Balkhadir E. (1994) Comparaison de la sensibilité de deux crustacés : *Gammarus gauthieri* et *Daphnia magna*, à la toxicité létale des extraits de sédiments de quatre cours d'eau marocains. *Annls limnol.* 30 (3) : 197-207
- Olson D.L & 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. & Fancey A. (1994) Biomarkers of stress in urban rivers : mixed function oxydase and acetylcholinesterase effects in brown trout in rivers in Saint-John's, Newfoundland. *Can. Tech. Rept. Fish. Aquati. Sci.* 1947, 23 p.
- Weber K. (1976) Degradation of parathion in sea water. *Water Research* 10 : 237-241
- Weiss C.M. & Gakstatter J.H. ( 1990) Detection of pesticides in water by biochemical assay. *Journal WPCF* 36 (2): 240-252
- Zinckel G.J., Shea P.J., Nakamoto R.J. & Callman J. (1987) Brain cholinesterase activity of rainbow trout poisoned by carbaryl. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 38 : 29-35