

CARACTÉRISTIQUES ÉCOPHYSIOLOGIQUES D'UNE POPULATION D'ANGUILLES DE CAMARGUE EXPOSÉE À UNE POLLUTION CLANDESTINE PAR DES POLLUANTS ORGANIQUES PERSISTANTS

Hélène ROCHE¹, Astrid BUET¹ et François RAMADE¹

SUMMARY

The assessment of the impact of an environmental disturbance on biological parameters in aquatic organisms involves the measure and calibration of the control values. In the fishes, the definition of ecophysiological standard values is difficult due to the diversity of origin and the variability of the sampled organisms. The scope of this study is to appraise the influence of ecophysiological parameters which could be considered as potential biomarkers of chemical contamination in eels of Camargue. These parameters stand as both morphometric and functional data: enzymatical activities involved in the energetic metabolism and the osmoregulation (gill and muscle ATPases); detoxification activities as the hepatic multienzymatic cytochrome P450-dependant system [ethoxyresorufine-*O*-deethylase (EROD), uridine diphospho-glucuronyl transferase (UDPGT) and glutathion *S*-transferases (GST)]; antioxidant enzymes [superoxide dismutases (SOD), selenium dependant glutathion peroxidase (SeGPx) and catalase], as well as neuronal activity (acetylcholinesterase, AChE). All over the 2 years (1999-2000) of our study, the size-weight relationship (on the basis of the condition index) proved well balanced in the sampled eel population without noticeable variations in three Vaccarès sites and in spite of chronic parasitism due to the nematode *Anguillicola crassus* (about 40% of the population). The major hepatic and muscular components (proteins, lipids and glycogen) showed a seasonal variability associated to the environmental factors and the energetic requirement of eels. The basal level of detoxification activities — EROD, GST and UDPGT — has proven hard to define due to a number of temporal variations of these enzymes probably linked to the thermal fluctuation occurring in the habitat and/or to ignored history of the exposure of the individuals of the sampled fishes to toxic xenobiotics. The sampling season stands as the major factor which acts on antioxidant system in liver and red blood cells. Nevertheless the nutritional status and maturity of the fishes exert as well a modulating effect on hepatic peroxydases. By contrast, the presence of the nematode *Anguillicola crassus* in swimbladder does not modify neither hepatic biotransformation activities nor oxydative metabolism. Despite a given data variability the gill ATPases does not seem influenced by the studied biotic and abiotic factors. At the opposite the muscular ATPase shows seasonal variations indicating an adaptive process to physical factors (temperature and salinity). Intensity of feeding promotes significant variations of the total ATPases activities relative to the need of ATP, but sexual maturity and parasitism have no influence. The muscle and brain AChE are obviously partly under the control of the nutritional status and, in a lesser extent, of the season one's but unrelated to maturity and parasitism. Finally, these studies carried out on the European eel stress the necessity to assess the natural range of variation of the ecophysiological parameters thereupon considered prior to their use as contamination biomarkers.

¹ Écologie et zoologie, CNRS UPRESA 8079, Écologie, Systématique et Évolution, Bât. 442, Université Paris-sud XI, F 91405 Orsay cedex - E-mail : helene.roche@ibaic.u-psud.fr

RÉSUMÉ

L'évaluation de l'impact d'une perturbation environnementale sur les principaux paramètres biologiques d'une population ou d'un peuplement implique la connaissance préalable des valeurs normales pour la ou les espèces considérées. Chez les poissons, par exemple, l'établissement de normes écophysiologiques de référence est complexe en raison de la diversité des causes de variations. Les travaux exposés ici ont eu pour objet de déterminer l'influence d'un certain nombre de facteurs écologiques (biotope de prélèvement et saison de capture, état nutritionnel, maturité sexuelle, parasitisme) sur des paramètres écophysiologiques susceptibles d'être considérés comme biomarqueurs sur les populations d'anguilles de Camargue. Il s'agit de données morphométriques et constitutives, d'activités enzymatiques impliquées dans des processus métaboliques énergétiques et l'osmorégulation (ATPases branchiales et musculaires), d'activités de détoxification comme le système multienzymatique cytochrome P450 dépendant hépatique ([éthoxyrésorufine-*O*-dééthylase (EROD), uridine diphospho-glucuronyl transférase (UDPGT) et glutathion *S*-transférases (GST)] et les activités antioxydantes hépatiques et érythrocytaires [superoxyde dismutases (SOD), glutathion peroxydase-sélénium dépendante (SeGPx) et catalase], ainsi que d'une activité neuronale (acétylcholinestérase, AChE). La population d'anguilles échantillonnée sur 2 ans (1999-2000) présente une relation taille-poids (indice de condition) équilibrée, sans différence notable due à l'origine des individus au sein du Vaccarès et malgré un parasitisme chronique par le nématode *Anguillicola crassus* (près de 40 % de la population). Les principaux constituants du foie et du muscle (protéines, lipides et glycogène) manifestent une variabilité saisonnière et annuelle, liée aux facteurs environnementaux et aux besoins énergétiques des anguilles. Le niveau basal des activités de détoxification EROD, GST et UDPGT est difficile à estimer par suite des nombreuses variations temporelles de ces enzymes. Celles-ci sont potentiellement attribuables aux fluctuations thermiques du milieu et/ou à l'histoire de l'exposition à des xénobiotiques des individus étudiés. De même, la saison s'avère être le facteur le plus influent sur les activités enzymatiques antioxydantes hépatiques et érythrocytaires. L'état nutritionnel et l'âge des individus présentent également un effet modulateur des activités peroxydasiques hépatiques. En revanche, la présence du nématode *Anguillicola crassus* dans la vessie gazeuse ne perturbe ni les activités de biotransformation hépatiques ni le métabolisme oxydatif. En dépit de la variabilité des données, l'activité ATPasique branchiale ne semble pas influencée par les différents facteurs biotiques et abiotiques pris en compte, à l'inverse les activités ATPasiques musculaires. Celles-ci montrent des variations saisonnières témoignant d'un phénomène d'adaptation aux facteurs physiques du milieu (température et salinité). L'intensité de la prise alimentaire engendre des variations significatives de l'activité ATPasique totale, liée aux besoins énergétiques en ATP, alors que ni la maturité sexuelle ni le parasitisme n'ont d'influence. L'état nutritionnel, et dans une moindre mesure la saison, modulent l'AChE cérébrale et musculaire, contrairement à la maturité sexuelle et au parasitisme. En conclusion, ces travaux réalisés chez l'Anguille confirment que la variabilité des réponses biologiques aux facteurs naturels implique une estimation des domaines de variations des biomarqueurs potentiels préalablement à l'évaluation de leur réponse à une exposition à des polluants.

INTRODUCTION

L'évaluation des conséquences physiotoxicologiques résultant de l'exposition d'un organisme vivant à un stress environnemental implique une évaluation aussi précise que possible des causes et des modalités de la perturbation. En outre, elle nécessite la connaissance des domaines de variations des valeurs normales des paramètres écophysiologiques dans la ou les populations exposées de l'espèce considérée. L'idéal serait de disposer d'un index pour une espèce donnée, mais les bilans sont souvent difficiles à interpréter et l'ambition d'établir un répertoire de valeurs écophysiologiques de référence est généralement pondérée par la multitude de facteurs externes dont elles dépendent. Les causes naturelles de variations sont

communes à la totalité des espèces propres à un habitat donné : elles sont liées à des facteurs écologiques majeurs, extrinsèques ou intrinsèques comme la saison, les caractéristiques physico-chimiques propres au biotope, le sexe, la maturité, etc. (Ramade, 1992). Néanmoins, leur importance relative dépend de l'espèce considérée. Elles tiennent également au fait que les données biologiques sont susceptibles de fluctuer selon la provenance des animaux, leurs conditions de vie (habitat, nutrition, etc.) sans omettre le fait qu'un biais lié au stress plus ou moins important que peut générer leur mode de capture peut apparaître. Ces quelques remarques illustrent la difficulté que représente l'élaboration de normes écophysiologiques de référence lorsque l'on se propose d'étudier les conséquences écotoxicologiques d'une pollution des eaux pour une population de poissons. L'impérieuse nécessité d'identifier des organismes-tests et des biomarqueurs permettant d'évaluer de façon aussi précoce que possible l'impact potentiel d'une pollution des eaux, s'est accompagnée d'un développement croissant des recherches au cours de la dernière décennie par suite de la fréquence, en augmentation continue, de certaines situations d'urgence. Parmi les espèces proposées, l'anguille figure au premier rang des espèces de référence pour la surveillance de la qualité des eaux continentales et littorales. En effet, ce poisson euryhalin, doté d'une grande valence écologique, constitue une excellente espèce « sentinelle » des zones humides en raison de son aptitude à bioconcentrer les polluants persistants, qu'ils soient minéraux ou organiques (Nuñez-Delgado, 1996 ; Buet, 2002). En outre, elle possède une caractéristique importante pour être utilisée comme espèce animale bioindicatrice : après une période de divagation de brève durée, généralement de l'ordre d'une année, le comportement des jeunes anguilles devient sédentaire. Elles s'installent sur un territoire d'une quinzaine d'ares en moyenne sur lequel elles vont séjourner. Ainsi, la contamination des individus provoquée par un polluant est localisée de façon précise car elle ne provient que de l'exposition *in situ*. En préalable aux recherches écotoxicologiques exposées par ailleurs dans le présent fascicule, nous faisons état dans cet article des résultats des études écophysiologiques que nous avons conduites dans une population d'anguilles du Vaccarès.

L'objet de nos investigations a été de préciser la nature et l'intensité de plusieurs processus métaboliques par l'analyse de paramètres biométriques (indices de condition), métaboliques (constitution tissulaire, réserve énergétique, activités ATPasiques), d'activités enzymatiques hépatiques de détoxification (système multienzymatique cytochrome P450 dépendant), de l'activité d'enzymes impliquées dans le métabolisme de l'oxygène au niveau hépatique et sanguin et de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) cérébrale et musculaire.

Les paramètres métaboliques ont été choisis par suite de leur implication dans les réponses à un stress chimique (Buet *et al.*, 1998). Les substrats énergétiques subissent de forts remaniements en fonction de la saison et du cycle de reproduction ; parmi eux, le glycogène constitue une forme rapidement mobilisable. Son taux musculaire et hépatique reflète l'état des réserves énergétiques d'un organisme et traduit l'altération éventuelle des processus de glycolyse ou de néoglucogénèse (Gimeno *et al.*, 1995 ; Teh *et al.*, 1997). Les lipides neutres représentent une forme de réserve à plus long terme et les lipides polaires sont les composants principaux des membranes cellulaires. Ainsi, au-delà du simple aspect énergétique, la teneur lipidique du muscle et du foie conditionne largement la bioaccumulation des polluants lipophiles. Le muscle, par son imprégnation, est un élément déterminant du phénomène de bioamplification (transmission de la

contamination au long de la chaîne alimentaire) et le tissu hépatique est impliqué dans la plupart des processus métaboliques, notamment dans les mécanismes de détoxification. Les taux de protéines, de glycogène et de lipides ont donc été évalués dans les tissus hépatique et musculaire.

La biotransformation des xénobiotiques organiques lipophiles au sein des différents organes consiste en la production de métabolites plus hydrosolubles que la molécule initiale (phase I) et en dérivés conjugués (phase II) afin de faciliter leur élimination. La mesure des activités enzymatiques associées à ces transformations, en particulier les activités cytochrome P450 dépendantes, a été développée comme biomarqueur. L'inductibilité de ces enzymes par les xénobiotiques a fait l'objet de nombreuses recherches. Chez les poissons, l'utilisation de l'activité éthoxyrésorufine-*O*-dééthylase (EROD) hépatique, et dans une moindre mesure des activités glutathion *S*-transférase (GST) et uridine diphosphoglucuronyl transférase (UDPGT), en tant que biomarqueurs de pollution sont désormais classiques (Stegeman et Lech, 1991 ; Flammarion *et al.*, 2000). L'usage de ces biomarqueurs implique la connaissance précise des conditions écologiques auxquelles les individus sont exposés car il est bien établi qu'un grand nombre de facteurs comme la température du milieu (Pacheco & Santos, 2001), l'âge et le sexe des individus (Forlin & Haux, 1990) ou l'alimentation (Grasman *et al.*, 2000) influe sur ces activités.

Lors des processus métaboliques endogènes ou exogènes, des dérivés de l'oxygène extrêmement réactifs, les radicaux libres, sont libérés. Cette formation d'oxyradicaux est contrôlée par des systèmes antioxydants. Les organismes aérobies possèdent des mécanismes de défense de nature enzymatique qui leur permet de réguler la concentration en radicaux libres ; ce sont essentiellement deux grandes catégories d'enzymes : les superoxydes dismutases (SOD) et les peroxydases dont les glutathion peroxydases (GPx et Se-GPx) et les catalases. Chez les poissons, de nombreux travaux ont validé la mesure de leur activité, tant au niveau sanguin qu'au niveau hépatique en tant que biomarqueurs aspécifiques (Roche & Bogé, 1996, 2000). La mesure des activités hépatiques et érythrocytaires antioxydantes, qui sont également largement modulées par les facteurs abiotiques, fait partie de nos investigations.

L'énergie métabolique nécessaire au transport actif des petites molécules est fournie par l'hydrolyse de l'ATP (adénosine-triphosphate). Ceci justifie l'intérêt des ATPases qui, outre leur rôle dans l'osmorégulation, constituent des cibles énergétiques pour un toxique. Précédemment nous avons montré que leurs activités branchiale et musculaire étaient largement influencées par les taux d'incorporation des xénobiotiques dans les compartiments lipidiques tissulaires (Buet *et al.*, 2001 ; Roche *et al.*, 2001, 2002). En complément, nous avons observé que l'activité acétylcholinestérase (AChE) musculaire et cérébrale, cible privilégiée des organophosphorés et des carbamates, et potentiellement altérée par des HAP et des métaux, était appropriée à l'étude des effets membranaires.

La présentation de l'ensemble de nos résultats collectés durant les années 1999 et 2000 a pour objectif de participer à l'établissement d'un référentiel des données chez les anguilles de la RNNC.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

LES ANGUILLES

L'anguille est une espèce de grande importance halieutique qui figure parmi celles de tout premier rang au plan économique. Cependant, tous les indices montrent actuellement une régression générale de ses populations dans toute l'Europe, voire sa complète disparition dans certaines régions. En conséquence, on note depuis une dizaine d'années une chute générale des prises ainsi qu'une décroissance des tailles des individus capturés. Ceci est dû principalement à des modifications naturelles ou anthropiques des facteurs environnementaux mais aussi à un phénomène nouveau, le parasitisme chronique dont cette espèce est atteinte.

Trois sites de prélèvements ont été choisis dans l'Etang de Vaccarès : — à l'embouchure du Canal de Fumemorte drainant les eaux d'irrigation des rizières captées dans le Rhône, — à la pointe de Mornès extrémité de la presqu'île du même nom, zone centrale éloignée des apports d'eau douce et — au niveau du site dit de La Capelière à 200 m au nord de Fumemorte. L'étude présentée ici porte sur 68 individus dont les caractéristiques biométriques sont présentées dans le tableau I.

L'anguille européenne adulte a une taille comprise entre 30 cm et 1 m (rarement 1,50 m) pour un poids variant de 300 g à 5 kg. Dans notre échantillonnage 85 % des individus pèsent entre 22 g et 250 g et 86 % mesurent entre 34,8 et 52,4 cm (Fig. 1). Elle a une longévité pouvant excéder 12 ans pour les femelles et entre 3 à 8 ans pour les mâles.

Ce poisson se nourrit essentiellement d'organismes vivant sur le fond : larves d'insectes, vers, crustacés, mollusques mais aussi œufs et poissons ; ceci la conduit à avoir des relations étroites avec les sédiments. Cette espèce sédentaire est essentiellement active la nuit, elle occupe des milieux aquatiques très différents : depuis les étangs littoraux jusqu'aux rivières de pré-montagne. La différenciation sexuelle apparaît à partir d'une taille proche de 25 cm. Les mâles dominent dans les zones côtières et les femelles dans les zones amont. La phase de croissance s'achève par une deuxième métamorphose transformant les anguilles jaunes en anguilles argentées, prêtes à regagner les profondeurs océaniques. L'étude présentée ici concerne essentiellement des anguilles immatures.

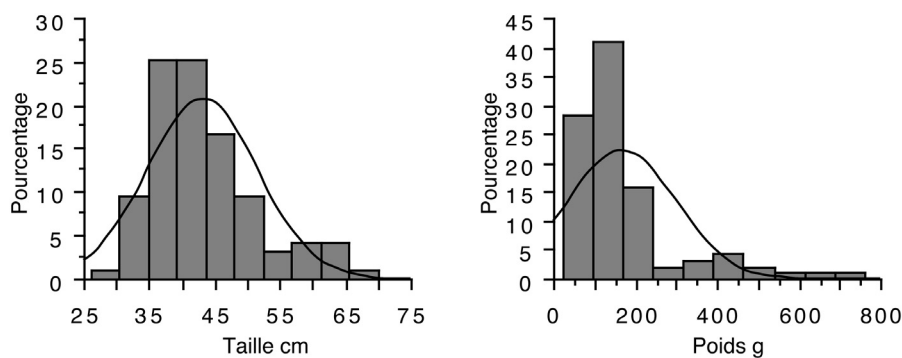


Figure 1. — Histogramme de fréquence des poids et tailles des anguilles analysées.

TABLEAU I

Présentation des anguilles qui ont fait l'objet de l'étude. Paramètres biométriques, dates, et sites de capture. N = nombre d'individus, Moyenne géométrique [valeur minimum-valeur maximum]. RHS = rapport hépatosomatique ; RGS = rapport gonadosomatique ; RVS = rapport viscérosomatique

Date	Site de capture	N	Poids g	Taille cm	RHS	RGS	RVS
juin 99	Fumemorte	11	133,9 [74,7 - 195,9]	42,3 [35,0 - 48,0]	1,28 [0,97 - 1,57]	0,15 [0,08 - 0,40]	2,41 [1,68 - 3,72]
	La Capelière	4	84,1 [22,0 - 391,7]	33,8 [23,0 - 62,0]	1,21 [1,07 - 1,52]	0,16 [< 0,05 - 0,50]	2,78 [2,01 - 4,06]
	Mornès	8	113,6 [51,5 - 225,9]	41,4 [31,0 - 51,0]	1,14 [0,83 - 1,54]	0,22 [< 0,05 - 0,22]	2,88 [1,54 - 4,01]
nov. 99	Fumemorte	9	150,1 [49,4 - 381,8]	44 [32,0 - 61,0]	1,33 [1,03 - 1,71]	0,39 [0,15 - 0,80]	4,62 [3,51 - 5,68]
	La Capelière	10	175,2 [90,0 - 465,8]	45,8 [37,0 - 63,0]	1,77 [1,30 - 2,21]	1,52 [< 0,05 - 1,52]	3,2 [1,44 - 4,98]
	Mornès	8	315,8 [131,8 - 760,0]	53,5 [41,0 - 70,0]	1,53 [1,25 - 2,32]	0,41 [0,04 - 1,62]	2,31 [1,23 - 4,40]
mai 00	Fumemorte	7	86,4 [55,0 - 136,3]	37,1 [31,9 - 42,9]	1,42 [0,98 - 1,90]	0,14 [0,07 - 0,20]	4,98 [3,46 - 7,17]
	La Capelière	7	107,6 [51,2 - 176,2]	39 [32,1 - 45,4]	1,56 [1,13 - 2,02]	0,16 [0,01 - 0,65]	4,45 [2,96 - 6,11]
	Mornès	4	165,2 [101,2 - 436,5]	43,8 [37,5 - 54,0]	1,65 [1,04 - 5,02]	0,43 [0,09 - 0,99]	5,04 [3,89 - 6,89]
oct. 00	Fumemorte	6	217,7 [92,7 - 560,0]	49,4 [38,5 - 63,0]	1,3 [0,99 - 1,59]	0,87 [0,73 - 1,05]	1,14 [0,54 - 2,16]
	La Capelière	8	119,4 [76,8 - 206,5]	40,9 [37,5 - 48,0]	1,14 [0,84 - 1,43]	0,22 [0,19 - 0,27]	1,63 [0,68 - 4,00]
	Mornès	6	139,3 [80,3 - 526,5]	42,6 [35,0 - 61,0]	0,89 [0,31 - 1,25]	0,28 [0,12 - 1,30]	1,05 [0,62 - 1,58]

LES PARAMÈTRES ÉCOPHYSIOLOGIQUES

ANALYSES MACROSCOPIQUES ET PARAMÈTRES BIOMÉTRIQUES

Des informations significatives de la « condition » des poissons sont données par des mesures biométriques : poids, taille, coefficient relatif de condition (K) évalué en référence à la population d'origine (n > 6000), indices hépatosomatique

(RHS), viscérosomatique (RVS), gonadosomatique (RGS) correspondant au rapport du poids des organes sur la masse corporelle. Des données ordinales ou qualitatives sont également collectées : coefficient de vacuité, parasitisme, nécroses, mycoses, etc.

LES BIOMARQUEURS D'EFFETS ÉCOTOXICOLOGIQUES

Biomarqueurs métaboliques

La constitution tissulaire du foie et du muscle est déterminée selon la technique précédemment décrite (Roche *et al.*, 2000). Brièvement, après extraction des lipides par la méthode de Folch *et al.* (1957), une digestion sodique du tissu sec est réalisée. La teneur en protéines est alors estimée par la technique de Lowry *et al.* (1951). Puis le glycogène précipité par de l'éthanol est traité par une glucamylase et le glucose libéré est dosé par une méthode enzymatique à la glucose-oxydase. Les teneurs en lipides totaux, protéines totales et glycogène renseignent sur l'état des réserves énergétiques et sur les potentialités de bioaccumulation des contaminants lipophiles. Les concentrations en phospholipides ont été déterminées sur des aliquotes de lipides totaux par la méthode de Fiske & Subbarow (1925).

Enzymes de biotransformation

L'activité EROD (phase I) est mesurée sur une fraction microsomale hépatique d'après la méthode de Burke & Mayer (1974). Les GST sont des enzymes participant à la phase II des processus de biotransformation des polluants cytotoxiques mutagènes qu'elles combinent avec le groupement - SH du glutathion réduit. Leur activité est mesurée selon la méthode de Habig *et al.* (1974). L'UDPGT est ancrée dans la membrane du réticulum endoplasmique et conjugue les xénobiotiques nucléophiles et certains composés endogènes avec l'UDP-acide glucuronique (UDPGA) (phase II). Son dosage est réalisé sur les fractions microsomales hépatiques d'après la méthode de Castren & Oikari (1983).

Les systèmes enzymatiques antioxydants

Les GPx catalysent la réduction conjointe d'un hydroperoxyde et d'un peroxyde organique, le glutathion. On distingue l'activité totale et sélénium-dépendante (Se-GPx), localisée dans le cytosol et dans la matrice mitochondriale. La mesure de ces activités est basée sur le suivi de la cinétique d'oxydation du NADPH, donneur d'électron, lors de la réduction du GSSG (glutathion oxydé) en GSH (réduit) (Tappel, 1978). Les SOD sont des métalloenzymes capables de dismuter l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Leur activité totale est évaluée par la mesure de l'inhibition de la transformation de l'adrénaline en adrénochrome par l'anion superoxyde fourni par le système hypoxanthine/xanthine oxydase (méthode adaptée de Misra & Fridovich, 1972). Localisée au niveau des peroxysomes, la catalase est une enzyme qui catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Son activité est estimée par la cinétique de disparition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Beers & Sizer, 1952).

Les activités de ce système multienzymatique cytosolique sont mesurées dans le foie et dans les érythrocytes.

Les enzymes membranaires

Les ATPases sont considérées comme des indicateurs sensibles de toxicité (Sancho *et al.*, 1997). Leur activité est estimée dans les branchies et les muscles par dosage colorimétrique du phosphore inorganique libéré après hydrolyse de l'ATP en ADP (Schmitz *et al.*, 1973). L'activité ouabaïne résistante est déduite de l'activité totale pour la mesure des Na⁺, K⁺-ATPases. Le principal rôle biologique de l'AChE est le contrôle de la transmission de l'influx nerveux au niveau des jonctions synaptiques cholinergiques. La mesure de son activité est réalisée sur des homogénats clarifiés de muscle et de cerveau selon la méthode d'Ellman *et al.* (1961).

ANALYSES STATISTIQUES

L'analyse statistique des données est effectuée avec le logiciel Statview 4.02 (Abacus concepts Inc., California) équipant un micro-ordinateur Macintosh. La répartition des mesures biologiques (biométrie, constitution biochimique tissulaire ou activité enzymatique) répond le plus souvent à une loi normale. Lorsque les valeurs sont distribuées selon une loi de Gauss (distribution normale) et que l'homogénéité de la variance est démontrée (ANOVA), elles sont exprimées par leur moyenne et leur erreur standard à la moyenne (SEM) pour une population d'effectif *n*. La démonstration statistique des effets recherchés est réalisée à l'aide de tests paramétriques. Notre étude reposant sur une comparaison entre deux séries non appariées, c'est le test *t* de Student par rapport à la moyenne qui est utilisé : les variations sont considérées comme significatives lorsqu'à l'issue de ce test la significativité présente une probabilité supérieure à 95 % ($p < 0,05$).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

PARAMÈTRES MORPHOMÉTRIQUES

Le poids des 68 anguilles analysées est compris entre 22 g et 760 g (Fig. 1). Cet échantillonnage est constitué de 48,4 % d'anguilles jaunes (« adultes ») et 51,6 % de juvéniles chez lesquels le rapport gonadosomatique (RGS) est inférieur à 0,05. Les indices biométriques offrent un grand intérêt pour évaluer les effets chroniques des pollutions. Les plus usuels sont les relations taille-poids (condition) et les indices RHS, RGS et RVS (Tableau I). Le RHS est souvent corrélé avec le degré de pollution. Tant que les poissons sont capables de s'alimenter, cet indice augmente en même temps que l'activité des systèmes de détoxification. Le RVS est le reflet de l'état nutritionnel des animaux au moment de leur capture (Fig. 3). Cet indice diminue chez des poissons soumis à un jeûne naturel ou provoqué par les conditions du milieu dans lequel ils se trouvent.

Chez de nombreuses espèces aquatiques, il existe une relation mathématique entre le poids et la taille des animaux qui caractérise leur embonpoint. Elle s'exprime mathématiquement par le coefficient relatif de condition (K) calculé à partir de plus de 6 000 individus de la population d'anguilles camarguaises. Voisin de 1, il dénote un bon équilibre pondéral ; dans le cas contraire il peut témoigner d'un effet d'une perturbation chronique.

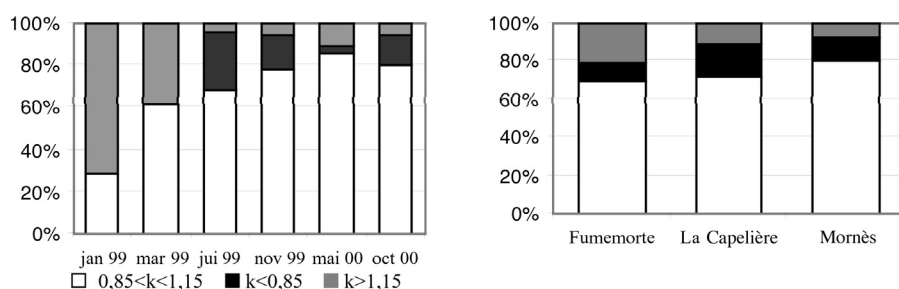


Figure 2. — Evolution saisonnière et inter-site du coefficient relatif de condition.

Une prépondérance numérique des anguilles montrant une relation taille/poids déséquilibrée est mise en évidence en hiver 1999. Il s'agit de poissons présentant un certain embonpoint (Fig. 2). A l'exception d'un déficit pondéral chez quelques individus en juin 99, l'équilibre est maintenu dans les échantillonnages effectués entre juin 1999 et octobre 2000. En outre, il n'apparaît aucune différence notable entre les divers sites de prélèvement.

L'analyse de l'état nutritionnel des anguilles est basée sur deux paramètres : le coefficient de vacuité déterminé par l'évaluation des proies en cours ou non de digestion dans l'appareil digestif et le RVS (Fig. 3).

L'analyse des contenus viscéraux montre que plus de 75 % des individus sont à jeun lors de leur capture en janvier et juin 1999 et en octobre 2000. Ceci est confirmé par le RVS pour les séries de janvier 1999 et d'octobre 2000. A l'opposé, les poissons pêchés en mars et novembre 1999 et en mai 2000 ont une activité alimentaire plus efficace comme en témoigne le RVS, notamment dans le cas de ces 2 dernières séries. Le coefficient de vacuité tend à montrer que les anguilles provenant du site de Mornès sont mieux nourries, mais ce constat n'est pas confirmé par l'analyse du RVS. Ces observations révèlent les difficultés d'interprétation de telles données qui, bien qu'elles soient facilement collectées et peu sujettes à l'erreur expérimentale, sont biaisées par d'autres facteurs inhérents au type même d'expérimentation. En effet il est probable qu'entre la capture dans les filets statiques et la relève de ceux-ci, les anguilles aient pu se nourrir des proies prisonnières des filets notamment des athérines et des invertébrés benthiques et pélagiques.

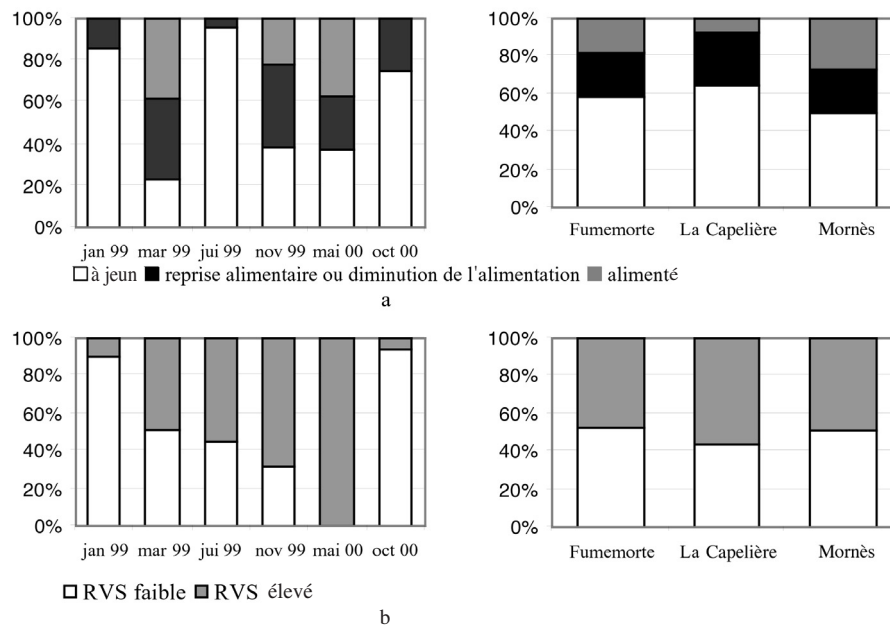


Figure 3. — Etat nutritionnel des anguilles estimé a) par le coefficient de vacuité et b) par le rapport viscérosomatique (RVS). Evolution saisonnière et variations inter-sites.

PARASITISME

L'anguille européenne est une espèce catadrome et poïkilohaline traditionnelle des milieux littoraux méditerranéens où elle représente une ressource halieutique essentielle. Cependant, on note depuis une dizaine d'années une chute de la production piscicole. Les modifications anthropiques des facteurs environnementaux sont les causes les plus souvent incriminées. Cependant le parasitisme chronique engendré par les nématodes du genre *Anguillicola* sp., espèce introduite du Japon, est un élément non négligeable de la régression des peuplements d'anguille. Dans cette étude, le pourcentage d'anguilles infestées est légèrement supérieur à la moyenne française, voisin de 30 %.

En effet, environ 40 % des individus sont parasités au niveau de la vessie gazeuse par *Anguillicola crassus*. Ce parasitisme présente une certaine stabilité au cours des deux années expérimentales bien qu'il accuse une légère baisse en octobre 2000 et semble moins prononcé chez les individus capturés à proximité de La Capelière (Fig. 4). Nous avons dénombré jusqu'à 18 nématodes chez certains individus lesquels présentaient une hémorragie au niveau de la vessie nataoire.

La présence du nématode *Anguillicola crassus* provoque chez l'anguille une élévation du cortisol plasmatique, effet qui s'apparente à un effet-stress (Sures *et al.*, 2001). Les anguilles infestées présenteraient également une altération de leur activité nataoire (Nimeth *et al.*, 2000) en particulier en milieu marin. Ce parasitisme est endémique dans de nombreuses rivières européennes, mais sa

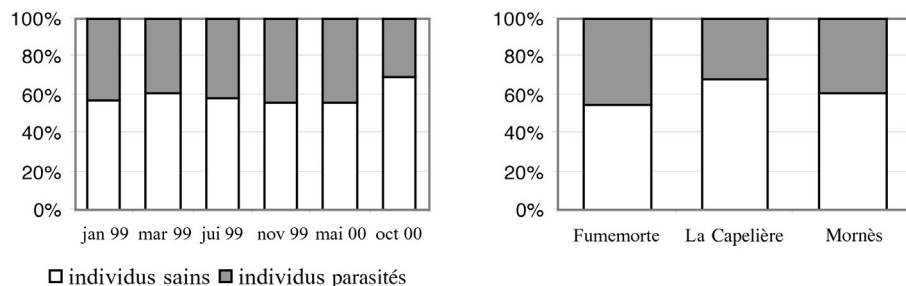


Figure 4. — Parasitisme des anguilles de Camargue par *Anguillicola crassus*. Evolution saisonnière et inter-sites.

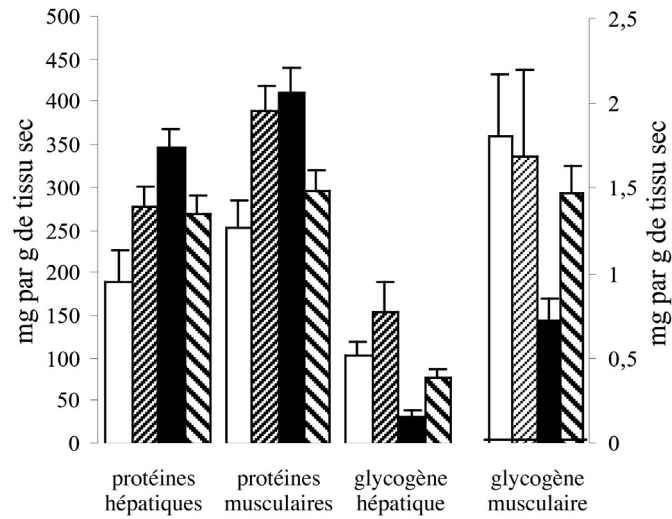
transmission est aussi possible en eau saumâtre — lagunes et estuaires — par des hôtes intermédiaires ; en revanche, en mer, elle est plus rare (Kirk *et al.*, 2000).

CONSTITUANTS TISSULAIRES

Chez les anguilles du Vaccarès capturées au cours des 4 campagnes d'échantillonnage de 1999 et 2000, les teneurs tissulaires en protéines totales exprimées par rapport à la matière sèche accusent une grande variabilité saisonnière et annuelle ainsi que le montrent les graphiques de la figure 5. Une faible concentration protéinique, aussi bien dans le foie que dans le muscle, est relevée chez les poissons prélevés au mois de juin 1999, alors que les 2 séries suivantes (novembre 1999 et mai 2000) ont des charges protéiques élevées. Cette apparente « carence » est partiellement compensée par le glycogène dont l'évolution est inverse, il présente notamment une teneur particulièrement basse en mai 2000.

Les teneurs en lipides tissulaires relativement stables lors des trois premières campagnes de prélèvement sont significativement augmentées en octobre 2000 (Fig. 6). Cette période correspond à la fin d'une période particulièrement chaude pendant laquelle les poissons se sont vraisemblablement abondamment alimentés. Les teneurs en phospholipides, très stables dans les muscles, sont très élevées dans le foie des anguilles analysées en mai 2000 où ils représentent plus de 50 % des lipides totaux, cette proportion ne dépassant pas 30 % dans les autres séries.

Le niveau des réserves métaboliques chez les poissons est lié à l'état nutritionnel et procure d'excellents marqueurs des activités consommatrices d'énergie. L'activité de reproduction est contemporaine de remaniements métaboliques profonds. Pendant toute la période qui précède la reproduction, les poissons accumulent des réserves sous forme essentiellement glucidique et lipidique. Elles seront utilisées lors de la maturation des gonades. La vitellogénèse mobilise toutes les réserves et exige une importante consommation d'énergie. Le métabolisme des lipides subit alors de notables changements. Lors de la maturation sexuelle, ces graisses sont utilisées à la fois pour l'élaboration des gonades mais aussi comme source d'énergie lorsque les poissons réduisent leur alimentation. Au moment de la reproduction, les réserves glycogéniques décroissent dans le foie et les muscles. Mais il arrive que cette source soit insuffisante pour répondre aux



□ juin 1999, n = 24 ; ▨ novembre 1999, n = 20 ; ■ mai 2000, n = 27 ; ▩ octobre 2000, n = 20

Figure 5. — Concentration en protéines et glycogène hépatiques et musculaires des anguilles capturées en 1999 et 2000, n = nombre d'individus.

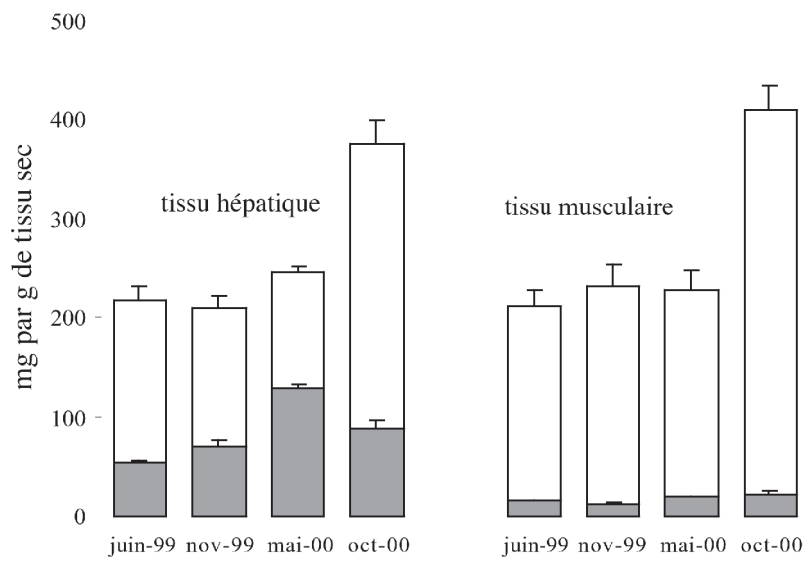


Figure 6. — Concentration en lipides hépatiques et musculaires des anguilles capturées en 1999 et 2000, □ lipides neutres ; ■ phospholipides.

besoins et une néoglycogénèse, à partir des acides aminés ou des lipides, restaure les stocks de glycogène en cours d'épuisement. Chez des poissons exposés à des contaminants organiques, il a été constaté *in situ* que les niveaux de glycogène et de lipides hépatiques étaient bien plus faibles que ceux des animaux de référence. Lorsque les poissons sont stressés, leur stratégie adaptative consiste à « sacrifier » la production des oeufs au profit du maintien des fonctions somatiques.

ACTIVITÉS ENZYMATIQUES

LES ENZYMES DE BIOTRANSFORMATION

A la suite de leur pénétration dans l'organisme, les xénobiotiques subissent des transformations métaboliques hépatiques ou extrahépatiques au cours desquelles un grand nombre d'enzymes est impliqué. Ces processus biochimiques de détoxification ont pour rôle de rendre hydrosolubles les composés organiques lipophiles afin de faciliter leur excrétion par voie biliaire, rénale ou branchiale. Le plus étudié d'entre eux est catalysé par les cytochromes P450 ; l'activité de trois enzymes de biotransformation, l'EROD, la GST et l'UDPGT, est déterminée dans le foie des anguilles afin d'évaluer l'impact des variations « normales » de facteurs biotiques et abiotiques.

Ces trois enzymes présentent des variations annuelles de grande amplitude et des fluctuations saisonnières particulièrement sensibles pour l'EROD (Tableau II). En effet elles sont plus actives chez les poissons analysés en 2000, qu'ils soient capturés à la fin du printemps ou en automne, et l'EROD est particulièrement stimulée en octobre 2000. A l'inverse, l'état nutritionnel, la maturité sexuelle et le parasitisme ne semblent pas être des facteurs influant sur le niveau d'activité de ces enzymes hépatiques.

Les processus enzymatiques de biotransformation, qui consistent à rendre plus hydrosolubles certaines molécules exogènes, en particulier les HAP et les PCB, constituent la phase I ou phase de fonctionnalisation. Celle-ci est essentiellement assurée par des monooxygénases à cytochrome P450 (MFO) et permet d'introduire dans la molécule un groupe polaire (EROD). La phase II, ou phase de conjugaison, assure la liaison d'une substance hydrophile endogène, comme le glutathion, avec ce groupe polaire et en permet ainsi l'élimination (UDPGT) et (GST). Ces enzymes sont inductibles et certaines comme l'EROD sont déjà utilisées dans les programmes de biosurveillance. Cependant l'induction des isoenzymes cytochrome P450 est particulièrement sensible aux fluctuations normales des facteurs abiotiques et sa validation en tant que biomarqueurs fait l'objet de controverses (Kirby *et al.*, 1999 ; Rotchell *et al.*, 1999), notamment en cas de contamination chronique du milieu (Blanchard *et al.*, 1999). Nos résultats montrent que l'activité « basale » de ces enzymes est difficile à déterminer *in situ* ; comme toutes les enzymes inductibles elles présentent une grande amplitude de réponses associées à une variabilité élevée. Nous avons relevé des variations « temporelles » significatives probablement liées à un ensemble d'éléments parmi lesquels le facteur température et le passé « toxicologique » récent des individus pourraient être prépondérants. Dans une étude similaire Rotchell *et al.* (1999) ont relevé un maximum d'activité de l'EROD hépatique en été et une activité 6 à 8 fois réduite en hiver. A l'opposé, Wilhelm *et al.* (2001) n'ont pas mis en évidence de variation

saisonnière de l'EROD hépatique chez le poisson *Geophagus brasiliensis* mais ont observé une hyperactivité GST au printemps par rapport à l'automne.

TABLEAU II

Variations des activités des enzymes hépatiques de biotransformation chez les anguilles du Vaccarès en fonction de paramètres abiotiques et biotiques

	n	EROD pM.mg ⁻¹ de protéines	GST μM.mg ⁻¹ de protéines	UDPGT nM.mg ⁻¹ de protéines
<i>Variations temporelles</i>				
juin 99	21-24	26,8 ± 10,3	129,0 ± 13,2 ^a	0,50 ± 0,09
nov. 99	14-20	60,3 ± 15,3	74,5 ± 5,0	0,77 ± 0,16
mai 00	24-26	155,9 ± 28,8 ^{ab}	477,6 ± 71,5 ^b	13,0 ± 2,1 ^b
oct. 00	20	423,9 ± 80,2 ^a	358,2 ± 42,3 ^b	7,03 ± 4,10
<i>Influence de l'état nutritionnel</i>				
à jeun	61-65	169,8 ± 33,6	257,0 ± 34,7	5,2 ± 1,6
nourries	21-25	151,2 ± 39,6	298,4 ± 51,6	7,4 ± 2,0
<i>Influence de la maturité sexuelle</i>				
juvéniles	46-48	120,1 ± 24,3	290,1 ± 37,1	7,4 ± 2,2
adultes	37-42	217,0 ± 49,1	243,8 ± 44,9	3,8 ± 1,1
<i>Influence du parasitisme (Anguillicola crassus)</i>				
saines	47-51	184,6 ± 36,1	278,2 ± 41,9	6,35 ± 2,05
infestées	37-39	139,7 ± 39,0	255,8 ± 38,1	5,13 ± 1,47

Indice placé à côté de la valeur la + élevée ; a : variation saisonnière significative dans la même année, b : variation annuelle significative à la même saison. Test *t* de Student $p < 0,005$.

ENZYMES IMPLIQUÉES DANS LE MÉTABOLISME OXYDATIF

La métabolisation des composés organiques lipophiles est susceptible d'entraîner une « détoxification » mais également la formation d'intermédiaires réactifs, qui peuvent manifester une toxicité surajoutée (Winston & Di Giulio, 1991). La plupart des mécanismes de biotransformation impliquent la réduction de l'oxygène moléculaire conduisant à la formation d'espèces hautement réactives telles que l'anion superoxyde, le radical hydroxyle, le peroxyde d'hydrogène ou le singulet d'oxygène. La production de ces radicaux extrêmement actifs se révèle être une conséquence de l'existence aérobie. Paradoxalement, ces espèces, essentielles à la vie en aérobie, sont très nocives (destruction de l'ADN, désactivation enzymatique, oxydation d'hormones, sénescence, altérations membranaires comme la lipoperoxydation, dommages oxydatifs des protéines, etc). L'organisme est

protégé par des systèmes enzymatiques associés, dont celui comprenant les superoxydes dismutases (SODs) et les peroxydases (Roche & Bogé, 1996). Une étude spécifique du métabolisme oxydatif au travers de sa régulation enzymatique dans le foie et les érythrocytes a été entreprise chez les anguilles du Vaccarès.

Réponses hépatiques

Les variations saisonnières des activités enzymatiques hépatiques sont nombreuses et anarchiques, elles sont liées d'une part aux facteurs physiques du milieu et d'autre part aux activités métaboliques des organismes. Elles se manifestent en 1999 par des valeurs élevées de toutes les activités impliquées dans le métabolisme des radicaux libres mesurées au mois de juin, et par une hyperactivité des enzymes liées au glutathion en octobre 2000 (Tableau III). En

TABLEAU III

Variations des activités des enzymes hépatiques impliquées dans le stress oxydatif chez les anguilles du Vaccarès en fonction de paramètres abiotiques et biotiques

	n	GPx $\mu\text{M.mg}^{-1}$ de protéines	Se-GPx $\mu\text{M.mg}^{-1}$ de protéines	Catalase mM.mg^{-1} de protéines	SODs U.mg^{-1} de protéines
<i>Variations temporelles</i>					
juin 99	23-24	42,5 \pm 2,9 ^a	32,0 \pm 6,0 ^a	724,5 \pm 54,3 ^{ab}	24,6 \pm 2,3 ^{ab}
nov. 99	20	20,8 \pm 2,5	13,9 \pm 1,3	176,6 \pm 12,5	10,5 \pm 1,6
mai 00	22-26	38,5 \pm 4,8	28,8 \pm 6,7	132,0 \pm 13,1	8,8 \pm 1,0
oct. 00	20	223,9 \pm 52,0 ^{ab}	127,0 \pm 16,3 ^{ab}	347,6 \pm 30,5 ^{ab}	13,4 \pm 2,8
<i>Influence de l'état nutritionnel</i>					
à jeun	63-65	93,0 \pm 19,3*	56,9 \pm 8,4*	393,5 \pm 35,4**	15,7 \pm 1,5
nourries	23-25	36,9 \pm 8,9	27,8 \pm 4,7	228,9 \pm 52,3	10,9 \pm 1,8
<i>Influence de la maturité sexuelle</i>					
juvéniles	46-48	63,8 \pm 13,7	59,8 \pm 9,8	406,6 \pm 49,0 [#]	15,9 \pm 1,7
adultes	40-42	92,3 \pm 26,3	36,7 \pm 7,8	280,5 \pm 30,3	12,7 \pm 1,6
<i>Influence du parasitisme (Anguillicola crassus)</i>					
saines	49-51	78,2 \pm 15,9	55,0 \pm 9,6	346,6 \pm 42,1	13,2 \pm 1,5
infestées	37-39	76,0 \pm 26,2	41,2 \pm 7,8	349,4 \pm 43,7	16,0 \pm 1,9

Test *t* de Student, indice placé à côté de la valeur la + élevée ; variation significative a : saisonnière dans la même année, b : annuelle à la même saison. *p* < 0,005 ; différence significative à jeun vs nourris **p* = 0,045, ***p* = 0,014 ; différence significative juvéniles vs adultes # *p* = 0,037.

outre d'importants écarts de variation de la catalase sont mis en évidence entre chacun des lots expérimentaux. Le jeûne stimule les peroxydases hépatiques, notamment la Se-GPx et la catalase. En effet, ces activités sont augmentées de 50 %

et 42 % respectivement chez les anguilles présentant un coefficient de vacuité proche de 0. Le niveau d'activité de la catalase est variable en fonction de l'âge des individus, elle est sensiblement plus élevée chez les jeunes anguilles (+ 31 % en moyenne) ; en revanche la présence du nématode *Anguillicola crassus* dans la vessie gazeuse ne perturbe pas le métabolisme oxydatif.

Réponses érythrocytaires

Un des rôles fondamentaux de l'érythrocyte est le transport de l'oxygène et d'une partie du gaz carbonique par le biais de la molécule d'hémoglobine, cette dernière étant sollicitée par tout métabolisme aérobie. L'auto-oxydation de l'hème libère des radicaux superoxydes qui peuvent réagir avec l'hémoglobine par un processus d'oxydation (oxyhémoglobine en méthémoglobine) ou de réduction (méthémoglobine en oxyhémoglobine) (Winterbourn, 1986). Nous avons montré précédemment chez *Dicentrarchus labrax* (Roche & Bogé, 1996) comme chez l'invertébré *Chironomus riparius* (Choi *et al.*, 2000) que les enzymes du stress oxydant jouent un rôle compensatoire palliant la diminution du taux d'hémoglobine, en maintenant une « désintoxication » anti-radicaux libres lors de stress chimiques et lorsque la pression d'oxygène est réduite. En effet, l'hypoxie est considérée comme une des sources principales de radicaux superoxydes et, dans une mesure moindre, de peroxyde d'hydrogène (Abele-Oeschger & Oeschger, 1995).

Les enzymes antioxydantes érythrocytaires présentent une aussi grande variabilité saisonnière que les enzymes hépatiques (Tableau IV). Elles sont globalement plus faibles chez les anguilles prélevées en juin 1999 à l'exception des SODs et généralement plus actives en 2000. Le point le plus significatif concerne la Se-GPx particulièrement stimulée en octobre 2000. L'état nutritionnel influe également sur l'activité catalasique, mais, contrairement à son activité hépatique, il induit une diminution chez les poissons à jeun. L'âge et le parasitisme n'influent pas sur les niveaux d'activité érythrocytaires. Le processus enzymatique antioxydant est naturellement autorégulé. Cependant un dérèglement ou une saturation des systèmes enzymatiques peuvent être occasionnés lors de chocs physiques ou chimiques et conduire à la peroxydation des lipides membranaires (Bridges, 1990) puis, à terme, à la mort cellulaire. Les membranes cellulaires des poissons marins et euryhalins sont d'autant plus sensibles qu'elles sont riches en acides gras polyinsaturés. Une éventuelle modification des activités enzymatiques impliquées dans ces phénomènes pourrait être la conséquence d'une production anormale de radicaux libres toxiques (Roche & Bogé, 1993).

Le facteur le plus influent sur les activités antioxydantes chez l'anguille, qu'elles soient hépatiques ou érythrocytaires, s'avère être la saison. Nous avons précédemment montré chez le loup (*Dicentrarchus labrax*), manifestant une activation estivale, que cette modulation était en grande partie liée au facteur température (Pérès & Roche, 1988). Plus récemment, les travaux de Wilhelm *et al.* (2001) chez *Geophagus brasiliensis* confirmaient que la stimulation des défenses enzymatiques antioxydantes révélées à la fin du printemps étaient en relation directe avec l'élévation de température du milieu chez ces espèces poikilothermes. L'état nutritionnel se révèle être un autre facteur agissant sur l'activité du système enzymatique antioxydant ; chez l'anguille, le jeûne a un effet stimulant tant au niveau hépatique que dans les globules rouges. A ce jour, la plupart des travaux relatifs aux effets de la nutrition sur l'activité de ces enzymes concerne la nature du

TABLEAU IV

Variations des activités enzymatiques érythrocytaires impliquées dans le métabolisme oxydatif chez les anguilles du Vaccarès en fonction de facteurs abiotiques et biotiques

	n	GPx $\mu\text{M.mg}^{-1}$ d'hémoglobine	Se-GPx $\mu\text{M.mg}^{-1}$ d'hémoglobine	Catalase $\mu\text{M.mg}^{-1}$ d'hémoglobine	SODs U.mg^{-1} d'hémoglobine
<i>Variations temporelles</i>					
juin 99	26	395,6 ± 42,0	74,9 ± 3,8	35,3 ± 2,9	2,04 ± 0,31 ^b
nov. 99	20	845,4 ± 175,8 ^a	108,5 ± 20,6	54,0 ± 12,6	1,23 ± 0,25
mai 00	26	623,9 ± 42,4 ^b	648,9 ± 63,4 ^b	75,6 ± 3,3 ^{ab}	0,88 ± 0,08
oct. 00	20	840,8 ± 85,4 ^a	1384,0 ± 196, ^{ab}	56,2 ± 3,6	0,96 ± 0,15
<i>Influence de l'état nutritionnel</i>					
à jeun	66	610,3 ± 42,2	554,4 ± 91,5	49,4 ± 2,7*	1,38 ± 0,15
nourries	26	767,5 ± 135,5	464,4 ± 89,4	70,2 ± 9,6	1,10 ± 0,18
<i>Influence de la maturité sexuelle</i>					
juvéniles	48	670,8 ± 80,3	568,7 ± 108,1	59,5 ± 5,9	1,37 ± 0,20
adultes	44	637,1 ± 53,7	485,7 ± 88,3	50,7 ± 3,1	1,22 ± 0,13
<i>Influence du parasitisme (Anguillicola crassus)</i>					
saines	52	652,6 ± 51,3	593,7 ± 101,1	53,6 ± 3,1	1,14 ± 0,13
infestées	40	657,4 ± 91,4	444,9 ± 93,6	57,5 ± 6,8	1,51 ± 0,22

Test *t* de Student, indice placé à côté de la valeur la + élevée ; variation significative a : saisonnière dans la même année, b : annuelle à la même saison. $p < 0,005$ différence significative à jeun vs nourris * : $p = 0,006$.

régime alimentaire. Ainsi, les rations supplémentées en sélénium (Jovanovic *et al.*, 1997) ou en acides gras polyinsaturés (Venugopal *et al.*, 2000) stimulent les activités antioxydantes, mais les effets de la privation de nourriture ont été peu étudiés chez les poissons. Par ailleurs, des variations circadiennes de la catalase synchrones des fluctuations du peroxyde d'hydrogène du milieu ont été décrites chez des bivalves (Angel *et al.*, 1999).

ATPASES ET ACHE

Activités branchiales

Chez la plupart des vertébrés marins et lagunaires, à l'exception des élasmobranches, la concentration en ions monovalents et la pression osmotique de

leur liquide extracellulaire sont souvent inférieures à celles du milieu ambiant. Ils ont développé plusieurs stratégies adaptatives pour compenser les pertes corporelles en eau d'origine osmotique. L'une, peu onéreuse d'un point de vue énergétique, consiste à réduire les perméabilités membranaires. L'autre consiste à réduire les flux urinaires et à accroître les entrées d'eau de boisson. Les ions monovalents sont absorbés en même temps, ce qui oblige ces organismes à en éliminer l'excédent. Cette extrusion s'effectue généralement au niveau des branchies grâce aux cellules à chlorures. Ce processus est très coûteux d'un point de vue énergétique, car il met en jeu de nombreux transports actifs, en particulier au niveau branchial pour l'extrusion du sodium. La fonction osmorégulatrice des animaux aquatiques est très sensible aux contaminants. Les ATPases y jouent un rôle-clé par leur participation dans le transport ionique et dans l'équilibre acido-basique. L'altération de ces processus peut résulter d'effets spécifiques portant sur l'activité des ATPases branchiales. Ils peuvent être intenses chez les espèces marines ou lagunaires, car l'activité de ces enzymes y est élevée.

Globalement l'activité des ATPases branchiales n'est pas influencée par les différents facteurs pris en compte (Tableau V) ; notons simplement une grande variabilité des données en novembre 1999. L'état nutritionnel, la maturité sexuelle et le parasitisme tels qu'ils ont été définis n'ont visiblement pas d'effets non plus ; cela pourrait s'expliquer par l'hétérogénéité de la distribution masquant des modifications trop ténues. Il est pourtant admis que, chez les téléostéens, les

TABLEAU V

Variations des activités des ATPases branchiales chez les anguilles du Vaccarès en fonction de paramètres abiotiques et biotiques

	n	ATPases totales $\mu\text{M} \cdot \text{mg}^{-1}$ protéines	NaK-ATPases $\mu\text{M} \cdot \text{mg}^{-1}$ protéines
<i>Variations temporelles</i>			
juin 99	23	83,6 ± 20,9	14,8 ± 5,7
nov. 99	21	191,5 ± 81,8	32,2 ± 18,2
mai 00	27	71,4 ± 5,9	11,8 ± 4,5
oct. 00	19	53,1 ± 11,0	9,0 ± 3,1
<i>Influence de l'état nutritionnel</i>			
à jeun	63	92,0 ± 20,9	15,0 ± 5,3
nourries	27	114,2 ± 48,0	20,7 ± 9,9
<i>Influence de la maturité sexuelle</i>			
juvéniles	45	115,3 ± 29,7	17,0 ± 6,1
adultes	45	82,0 ± 28,2	16,4 ± 7,3
<i>Influence du parasitisme (Anguillicola crassus)</i>			
saines	52	65,8 ± 6,5	12,8 ± 3,3
infestées	38	143,7 ± 46,9	22,1 ± 10,3

ATPases sont largement hormono-dépendantes, du fait, entre autres, du contrôle endocrinien de l'osmorégulation (Leena & Oommen, 2000). Aussi des variations saisonnières liées à la migration et/ou plus généralement aux variations de salinité sont classiques chez les espèces migratrices euryhalines. Par exemple chez le saumon, à la période de la smoltification, qui a lieu l'été en eau de mer, Handeland & Stefansson (2001) ont observé une augmentation de la tolérance hyperosmotique due à une augmentation de l'activité Na^+ , K^+ -ATPase.

En revanche, en hiver le passage expérimental en eau de mer n'altère pas l'activité de ces enzymes branchiales (Handeland *et al.*, 2000). En effet, l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase branchiale est le reflet de l'activité de la pompe à sodium, soumise elle-même à des régulations endocriniennes : elle est notamment stimulée par les hormones thyroïdiennes T3 et T4 (Peter *et al.*, 2000), par l'hormone de croissance (GH) et par le cortisol (Wong & Chan, 2001). Ce dernier induit non seulement l'activité Na^+ , K^+ -ATPase mais également l'activité Mg^{2+} -ATPase, suggérant une stimulation des pompes ioniques et de ses activités métaboliques associées. Ces enzymes sont également sollicitées lors de l'adaptation en eau de mer diluée.

Activités enzymatiques musculaires et cérébrales

En ce qui concerne les ATPases musculaires, le constat est différent (Tableau VI). Elles sont significativement stimulées en octobre 2000, témoignant ainsi de l'existence d'une modulation du métabolisme énergétique ; celle-ci est potentiellement induite par les fluctuations de « facteurs climatiques » (température, salinité). Ces résultats rendent compte d'un phénomène adaptatif à la fin de la période estivale, du type de celui décrit par Wakeling *et al.*, en 2000. Ces auteurs ont, en effet, mis en évidence chez *Cyprinus carpio* les modalités de l'adaptation thermique des activités Mg^{2+} - et Ca^{2+} -ATPase myofibrillaires. Par ailleurs, une diminution de la prise alimentaire engendre une élévation de l'activité totale en relation à une demande énergétique en ATP. En revanche, ni la maturité sexuelle ni le parasitisme n'entraînent ici d'effet significatif.

L'inhibition de l'AChE bloque la transmission de l'influx nerveux au niveau des divers types de synapses cholinergiques. Sa mesure au niveau cérébral est depuis longtemps proposée chez les invertébrés pour évaluer les conséquences de l'exposition à certains insecticides (Ramade, 1964). Elle a été ensuite préconisée comme indicateur spécifique de la présence d'insecticides organophosphorés et de carbamates dans des biotopes terrestres provoquant une exposition des populations d'oiseaux (Ludke *et al.*, 1975 ; Zinkl *et al.*, 1977 ; Grue *et al.*, 1982 ; Mineau & Peakall, 1987). De même, cette activité a été utilisée chez les poissons pour évaluer l'exposition de peuplements lagunaires consécutive à des campagnes de traitements contre des gîtes larvaires de moustiques par des insecticides organophosphorés (Thirugnanam & Forgash, 1975). Plus récemment, Fulton & Key (2001) ont réalisé une mise au point sur l'utilisation de la mesure de l'inhibition de l'AChE cérébrale pour apprécier l'impact de l'exposition de populations de poissons à ce type de pesticide. De plus, la mesure de cette activité a été utilisée comme biomarqueur d'autres xénobiotiques tels que les pyréthrinoides (Balint *et al.*, 1997) et accessoirement les métaux lourds (Liao & Lin, 2001). Chez les anguilles du Vaccarès, une activité AChE cérébrale deux fois plus élevée dans les lots capturés en 1999 a été relevée alors qu'au niveau musculaire l'AChE est particulièrement peu active (Tableau VI). Exceptée l'éventualité d'une contamination du milieu par

TABLEAU VI

Variations d'activités enzymatiques membranaires — ATPasiques et acétylcholinestérasiques — dans le muscle et/ou le cerveau des anguilles du Vaccarès en fonction de paramètres abiotiques et biotiques

		• Réponses musculaires			• Réponse cérébrale
	n	ATPases totales $\mu\text{M.mg}^{-1}$ de protéines	NaK-ATPases $\mu\text{M.mg}^{-1}$ de protéines	AChE nM.mg^{-1} de protéines	AChE cérébrale nM.mg^{-1} de protéines
<i>Variations temporelles</i>					
juin 99	25-27	12,75 \pm 2,81	1,96 \pm 0,45	22,4 \pm 2,3	109,0 \pm 15,0 ^b
nov. 99	20-21	8,97 \pm 1,47	1,67 \pm 0,85	40,6 \pm 2,1 ^a	116,0 \pm 2,6 ^b
mai 00	27	11,66 \pm 1,61	0,72 \pm 0,12	99,4 \pm 3,3 ^{ab}	50,0 \pm 4,2 ^a
oct. 00	20	32,25 \pm 7,44 ^{ab}	8,15 \pm 4,97 ^b	59,0 \pm 9,0	28,0 \pm 1,8
<i>Influence de l'état nutritionnel</i>					
à jeun	67	18,41 \pm 2,75*	3,62 \pm 1,53	50,64 \pm 4,40	75,0 \pm 7,6
nourries	25	8,98 \pm 0,88	0,88 \pm 0,20	71,80 \pm 7,28**	80,0 \pm 7,7
<i>Influence de la maturité sexuelle</i>					
juvéniles	48-49	15,5 \pm 2,1	1,8 \pm 0,4	55,1 \pm 5,2	78,0 \pm 10,0
adultes	44-46	16,2 \pm 3,7	4,0 \pm 2,3	58,2 \pm 5,9	75,0 \pm 5,6
<i>Influence du parasitisme (Anguillicola crassus)</i>					
saines	52-53	16,7 \pm 3,1	3,9 \pm 2,0	58,3 \pm 5,5	67,0 \pm 5,9
infestées	40	14,7 \pm 2,5	1,6 \pm 0,3	54,3 \pm 5,4	90,0 \pm 11,0

Test *t* de Student, indice placé à côté de la valeur la + élevée ; variation significative a : saisonnière dans la même année, b : annuelle à la même saison. $p < 0,005$; différence significative à jeun vs nourris * $p = 0,041$, ** $p = 0,013$.

des substances inhibitrices (organophosphorés ou carbamates) en 2000, la variabilité des réponses et l'inadéquation de celles-ci entre le tissu cérébral et le tissu musculaire peuvent être mises sur le compte de variations naturelles. El Alfy *et al.* (2001) ont récemment évoqué l'existence d'une modulation de la réponse au stress chimique de l'AChE en fonction de facteurs environnementaux, comme la salinité, l'âge et la maturité sexuelle des individus. Cependant, nous n'avons pas relevé de variation de ces activités AChE entre les adultes et les juvéniles. En revanche, les anguilles à jeun ou en phase de réduction alimentaire présentent un affaiblissement de l'activité AChE musculaire. Cette diminution dans le muscle des poissons moins alimentés est potentiellement une réponse physiologique qui découle probablement d'une réponse biochimique structurale. Si l'effet du jeûne sur ces activités n'a pas fait l'objet de recherches, de nombreuses études portent sur la nature de l'alimentation et en particulier sur la saturation des acides gras de la

ration. Il est admis que les lipides alimentaires influent sur les structures membranaires. Les conséquences au niveau des activités fonctionnelles — notamment du cerveau — ne sont pas encore clairement démontrées. Néanmoins Salvati *et al.* (1996) ont montré chez le rat, que les modifications du régime alimentaire induisaient des modifications du système cholinergique. Chez le poisson, ces effets membranaires sont déterminants, car leurs lipides sont riches en acides gras polyinsaturés. Enfin le parasitisme, dans notre étude, n'induit aucune variation significative de l'activité des AChE cérébrales et musculaires.

CONCLUSION

Les principes méthodologiques sur lesquels se fonde l'usage de biomarqueurs *in situ*, reposent sur la mise en évidence de déséquilibres biochimiques ou physiologiques susceptibles de révéler précocement l'exposition d'une population d'une espèce donnée à de faibles concentrations de polluants (Van der Oost *et al.*, 1997). Cependant le choix de ces indicateurs biologiques, basé sur leur sensibilité au stress chimique, nécessite aussi la prise en compte des fluctuations naturelles — annuelles, saisonnières, circadiennes — ; de celles liées au milieu aquatique — température, salinité, pression — ; de celles inhérentes au stade de développement et de celles, intrinsèques, propres aux individus — âge, maturité, sexe, état nutritionnel— voire même de celles associées à des processus adaptatifs comme le parasitisme (Jørgensen *et al.*, 1999 ; Kelly *et al.*, 2000). Dans la population d'anguilles du Vaccarès, un certain nombre de ces facteurs coexiste et nous avons tenté d'en estimer les effets. Les évolutions temporelles et l'état nutritionnel s'avèrent être les facteurs prépondérants dans la modulation des réponses enzymatiques. Bien que la liste des paramètres biochimiques présentés dans cette étude ne soit pas exhaustive, l'évaluation du domaine dans lequel fluctuent les valeurs propres aux écarts naturels de variation représente une démarche indispensable. En effet, celle-ci a permis d'établir un référentiel en préalable aux recherches écotoxicologiques de terrain, les données acquises au cours de ces dernières devant nécessairement être comparées à ces références pour évaluer la nature et l'ampleur des perturbations générées par l'exposition chronique aux polluants présents dans les biotopes aquatiques.

RÉFÉRENCES

- ABELE-OESCHGER, D. & OESCHGER, R. (1995). — Hypoxia-induced autoxidation of haemoglobin in the benthic invertebrates *Arenicola marina* (Polychaeta) and *Astarte borealis* (Bivalvia) and the possible effects of sulphide. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 187 : 63-80.
- ANGEL, D.L., FIEDLER, U., EDEN, N., KRESS, N., ADELUNG, D. & HERUT, B. (1999). — Catalase activity in macro- and microorganisms as an indicator of biotic stress in coastal waters of the eastern Mediterranean Sea. *Helgoland Mar. Res.*, 53 : 209-218.
- BALINT, T., FERENCZY, J., KATAL, F., KISS, I., KRACZER, L., KUFCSAK, O., LANG, G., POLYHOS, C., SZABO, I., SZEGLETES, T. & NEMCSOK, J. (1997). — Similarities and differences between the massive eel (*Anguilla anguilla* L.) devastations that occurred in Lake Balaton in 1991 and 1995. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 37 : 17-23.

- BEERS, J.R. & SIZER, L.W. (1952). — A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.*, 195 : 133-140.
- BLANCHARD, M., TEIL, A.M., CARRU, A.M., OLLIVON, D., GARBAN, B., CHESTERIKOFF, A. & CHEVREUIL, M. (1999). — PCB and PAH impacts on cytochrome P-450-dependent oxidases in roach (*Rutilus rutilus*) from the Seine River (France). *Arch. Environ. Contamin. Toxicol.* 37 : 242-250.
- BUET, A. (2002). — *Impact biologique des HAP chez l'Anguille européenne. Définition et validation de biomarqueurs in situ*. Thèse de Doctorat, Université Paris-Sud XI, 194 p.
- BUET, A., ROCHE, H., ANHEIM, S. & RAMADE, F. (2001). — Méthode d'évaluation du niveau de contamination par des polluants organiques persistants des communautés de la Réserve de Biosphère de Camargue. *Ichthyophysiological Acta*, 23 : 57-70.
- BUET, A., ROCHE, H., HABERT, H., CAQUET, T. & RAMADE, F. (1998). — Evaluation du niveau de contamination par les micropolluants organiques des poissons de la Réserve de Biosphère de Camargue. Proposition d'un plan expérimental pour la validation de biomarqueurs utilisables *in situ*. *Ichthyophysiological Acta*, 21 : 61-76.
- BURKE, M.D. & MAYER, R.T. (1974). — Ethoxyresorufin : direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug. Metab. Dispos.*, 6 : 583-588.
- CASTREN, M. & OIKARI, A. (1983). — Optimal assay conditions for liver UDP-glucuronosyl transferase from the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 76C : 365-369.
- CHOI, J., ROCHE, H. & CAQUET, T. (2000). — Effects of physical (hypoxia, hyperoxia) and chemical (potassium dichromate, fenitrothion) stress on antioxidant enzyme activities in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) larvae : Potential biomarkers. *Environ Toxicol. Chem.*, 19 : 495-500.
- EL ALFY, A.T., GRISLE, S. & SCHLENK, D. (2001). — Characterization of salinity-enhanced toxicity of aldicarb to Japanese medaka : Sexual and developmental differences. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20 : 2093-2098.
- ELLMAN, G.L., COURTNEY, K. D., ANDRES, V. & FEATHERSTONE, R.M. (1961). — A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7 : 88-95.
- FISKE, C. & SUBBAROW, Y. (1925). — The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 66 : 375-400.
- FLAMMARION, P., GARRIC, J. & MONOD, G. (2000). — Use of EROD enzymatic activity in freshwater fish. Pp. 59-77 in L. LAGADIC, T. CAQUET, J.C. AMIARD & F. RAMADE (eds) *Use of biomarkers for environmental quality assessment*. Science Publishers, Inc.
- FOLCH, J., LESS, M. & SLOANE-STANLEY, G.H. (1957). — A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226 : 497-509.
- FORLIN, L. & HAUX, C. (1990). — Sex differences in hepatic cytochrome P450 monooxygenase activities in rainbow trout during an annual reproductive cycle. *J. Endocrinol.*, 124 : 207-213.
- FULTON, M.H. & KEY, P.B. (2001). — Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20 : 37-45.
- GIMENO, L., FERRANDO, M.D., SANCHEZ, S., GIMENO, L.O. & ANDREU, E. (1995). — Pesticide effects on eel metabolism. *Ecotox. Environ. Saf.*, 31 : 153-157.
- GRASMAN, K.A., SCANLON, P.F. & FOX, G.A. (2000). — Geographic variation in hematological variables in adult and pre-fledgling herring gulls (*Larus argentatus*) and possible associations with organochlorine exposure. *Arch. Environ. Contamin. Toxicol.*, 38 : 244-253.
- GRUE, C., POWELL, G.V.N. & GORSUCH, C.G. (1982). — Assessing effects of organophosphates on songbirds : comparison of a captive and free living population. *J. Wild. Manage.*, 46 : 766-768.
- HABIG, W.H., PABST, M.J. & JAKOBY, W.B. (1981). — Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acids formation. *J. Biol. Chem.*, 249 : 7130-7139.
- HANDELAND, S.O., BERGE, A., BJORNSSON, B.T., LIE, O. & STEFANSSON, S.O. (2000). — Seawater adaptation by out-of-season Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts at different temperatures. *Aquaculture*, 181 : 377-396.
- HANDELAND, S.O. & STEFANSSON, S.O. (2001). — Photoperiod control and influence of body size on off-season parr-smolt transformation and post-smolt growth. *Aquaculture*, 192 : 291-307.
- JORGENSEN, E.H., BYE, B.E. & JOBLING, M. (1999). — Influence of nutritional status on biomarker responses to PCB in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquat. Toxicol.* 44 : 233-44.
- JOVANOVIC, A., GRUBOR-LAJŠIĆ, G., DJUKIĆ, N., GARDINOVAČKI, G., MATIĆ, A. & SPASIĆ, M. (1997). — The effect of selenium on antioxidant system in erythrocytes and liver of the carp (*Cyprinus carpio* L.). *Crit. Rev. Food Sci. Nat.*, 37 : 443-448.

- KELLY, C.E., KENNEDY, C.R. & BROWN, J.A. (2000). — Physiological status of wild European eels (*Anguilla anguilla*) infected with the parasitic nematode, *Anguillicola crassus*. *Parasitology*, 120 : 195-202.
- KIRBY, M.F., MATTHIESSEN P., NEALL, P., TYLOR, T., ALLCHIN, C.R., KELLY, C.A., MAXWELL, D.L. & THAIN, J.E. (1999). — Hepatic EROD activity in flounder (*Platichthys flesus*) as an indicator of contaminant exposure in English estuaries. *Mar. Poll. Bull.*, 38 : 676-686.
- KIRK, R.S., LEWIS, J.W., KENNEDY, C.R. (2000). — Survival and transmission of *Anguillicola crassus* Kuwahara, Niimi and Itagaki, 1974 (Nematoda) in seawater eels. *Parasitology*, 120 : 289-295.
- LEENA, S. & OOMMEN, O.V. (2000). — Hormonal control on enzymes of osmoregulation in a teleost, *Anabas testudineus* (Bloch) : An *in vivo* and *in vitro* study. *Endocrine Res.*, 26 : 169-187.
- LIAO, C.M. & LIN, M.C. (2001). — Acute toxicity modeling of rainbow trout and silver sea bream exposed to waterborne metals. *Environ. Toxicol.*, 16 : 349-360.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951). — Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265-275.
- LUDKE, J.L., HILL, E.F. & DIETER, M.P. (1975). — Cholinesterase (CHE) response and related mortality among birds fed CHE inhibitors. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 3 : 1-21.
- MINEAU, P. & PEAKAL, D. (1987). — An evaluation of avian impact assessment techniques following broad scale forest insecticide sprays. *Environ. Toxicol. Chem.*, 6 : 781-791.
- MISRA, H.P. & FRIDOVICH, I. (1972). — The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 247 : 6960-6962.
- NIMETH, K., ZWERGER, P., WURTZ, J., SALVENMOSER, W. & PELSTER B. (2000). — Infection of the glass-eel swimbladder with the nematode *Anguillicola crassus*. *Parasitology*, 121 : 75-83.
- NUÑEZ-DELGADO, A. (1996). — L'anguille européenne (*Anguilla anguilla* L.). Effets de la pollution du milieu. *Rev. Real Acad. Galega Cienc.*, 15 : 51-79.
- PACHECO, M. & SANTOS, M.A. (2001). — Tissue distribution and temperature-dependence of *Anguilla anguilla* L. EROD activity following exposure to model inducers and relationship with plasma cortisol, lactate and glucose levels. *Environ. Intern.*, 26 : 149-155.
- PÉRÈS, G. & ROCHE, H. (1988). — Essai de "Suivi sanitaire" d'un élevage de poissons marins (*Dicentrarchus labrax*) au moyen du dosage de constituants plasmatiques et d'activités enzymatiques tissulaires. *Sci. Vét. Méd. Comp.*, 89 : 297-313.
- PETER, M.C.S., LOCK, R.A.C. & BONGA, S.E.W. (2000). — Evidence for an osmoregulatory role of thyroid hormones in the freshwater mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 120 : 157-167.
- RAMADE, F. (1964). — L'action anticholinestérasiqne de quelques insecticides organophosphorés sur le système nerveux central de *Musca domestica*. *Ann. Soc. Ent. Fr.*, 1 : 549-566.
- RAMADE, F., (1992). — *Précis d'Écotoxicologie*. Masson, Paris, p. 177 et suiv.
- ROCHE, H. & BOGÉ, G. (1993). — *In vitro* effects of Cu, Zn and Cr salts on antioxidant enzyme activities of red blood cells of marine fish *Dicentrarchus labrax*. *Toxicol. in vitro*, 7 : 623-629.
- ROCHE, H. & BOGÉ, G. (1996). — Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical intoxication. *Marine Environ. Res.*, 41 : 27-43.
- ROCHE, H. & BOGÉ, G. (2000). — *In vivo* effects of phenolic compounds on blood parameters of a marine fish (*Dicentrarchus labrax*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 125C : 345-353.
- ROCHE, H., BUET, A., JONOT, O. & RAMADE, F. (2000). — Organochlorine residues in european eel (*Anguilla anguilla*), crusian carp (*Carassius carassius*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*) from Vaccares lagoon (French National Reserve of Camargue)-Effects on some physiological parameters. *Aquat. Toxicol.*, 48 : 443-459.
- ROCHE, H., BUET, A. & RAMADE, F. (2002). — Accumulation of lipophilic microcontaminants and biochemical responses in eels from the Biosphere Reserve of Camargue. *Ecotoxicology*, vol. 11, p. 155-164.
- ROCHE, H., DORVAL, J., BUET, A., FREITAS, S. & RAMADE, F. (2001). — Contamination des anguilles de la Réserve Naturelle de Camargue par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) et recherche de biomarqueurs. *Ichthyophysiological Acta*, 23 : 71-85.
- ROTCHHELL, J.M., BIRD, D.J. & NEWTON, L.C. (1999). — Seasonal variation in ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity in European eels *Anguilla anguilla* and flounders *Pleuronectes flesus* from the Severn Estuary and Bristol Channel. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 190 : 263-270.
- SALVATI, S., ATTORRI, L., DI FELICE, M., MALVEZZI-CAMPEGGI, L., PINTOR, A., TIBURZI, F. & TOMASSI, G. (1996). — Effect of dietary oils on brain enzymatic activities (2'3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase and acetylcholinesterase) and muscarinic receptor sites in growing rats. *J. Nutr. Biochem.*, 7 : 113-117.

- SANCHO, E., FERRANDO, M.D. & ANDREU, E. (1997). — Inhibition of gill Na⁺,K⁺-ATPase activity in the eel, *Anguilla anguilla*, by fenitrothion. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38 : 132-136.
- SCHMITZ, J., PREISER, H., MAESTRACCI, D., GHOSH, B.K., CERDA, J.J. & CRANE, R.K. (1973). — Purification of the human intestinal brush border membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, 323 : 98-112.
- SURES, B., KNOPF, K. & KLOAS, W. (2001). — Induction of stress by the swimbladder nematode *Anguillicola crassus* in European eels, *Anguilla anguilla*, after repeated experimental infection. *Parasitology*, 123 : 179-184.
- TAPPEL, A.L. (1978). — Glutathione peroxidase and hydroperoxides. *Meth. Enzym.*, 52 : 506-513.
- TEH, S.J., ADAMS, S.M. & HINTON, D.E. (1997). — Histopathologic biomarkers in feral fresh-water fish populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquat. Toxicol.*, 37 : 51-70.
- THIRUGNAMAM, H.M. & FORGASH, A.J. (1975). — Environnement impact of mosquito pesticides : influence of temephos on the brain acetylcholinesterase of killifish. *Envir. Physiol. Biochem.*, 5 : 451-459.
- VAN DER OOST, R., VINDIMIAN, E., VAN DEN BRINK, P.J., SATUMALAY, K., HEIDA, H. & VERMEULEN, N.P.E. (1997). — Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). III. Statistical analysis of relationships between contaminant exposure and biomarkers. *Aquat. Toxicol.*, 39 : 45-75.
- VENUGOPAL, V., LAKSHMANAN, R., DOKE, S.N. & BONGIRWAR, D.R. (2000). — Enzymes in fish processing, biosensors and quality control : A review. *Food Biotech.*, 14 : 21-77.
- WAKELING, J.M., COLE, N.J., KEMP, K.M. & JOHNSTON, I.A. (2000). — The biomechanics and evolutionary significance of thermal acclimation in the common carp *Cyprinus carpio*. *Am. J. Physiol.*, 48 : R657-R665.
- WILHELM, D., TORRES, M.A., TRIBESS, T.B., PEDROSA, R.C. & SOARES, C.H.L. (2001). — Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acara (*Geophagus brasiliensis*). *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 34 : 719-726.
- WINSTON, G.W. & DI GIULIO, R.T. (1991). — Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19 : 137-161.
- WINTERBOURN, C.C. (1986). — Reactions of superoxide with hemoglobin. Pp. 137-141 in R.A. GREENWALD (ed.) *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, USA.
- WONG, C.K.C. & CHAN, D.K.O. (2001). — Effects of cortisol on chloride cells in the gill epithelium of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *J. Endocrinol.*, 168 : 185-192.
- ZINKL, J.G., HENNY, C. J. & DEWEESE, L.R. (1977). — Brain cholinesterase activities of birds from forests sprayed with trichlorfon (Dylox) and carbaryl (Sevin-4-Oil). *Bull. Env. Contam. Toxicol.*, 17 : 379-386.