

EFFETS DU CADMIUM SUR L'ACTIVITE DE L'ACETYLCHOLINESTERASE ET SUR LES CELLULES CILIEES DU SYSTEME DE LA LIGNE LATERALE DE *Gambusia affinis* (POISSON, TELEOSTEEN)

Reçu le 16-02-2010 – Accepté le 22/11/2010

Résumé

Dans cette étude expérimentale nous nous sommes intéressés au cadmium, un métal lourd fréquemment rencontré dans les écosystèmes aquatiques situés dans des zones urbanisées et industrialisées. Ce travail vise à évaluer l'impact du cadmium, dilué à différentes doses (1 et 5 µg/l) dans l'eau de divers lots de *Gambusia affinis*, par le dosage de certains substrats et enzymes indicateurs de stress oxydatif : le GSH et la GST (au niveau du foie) et notamment l'acétylcholinestérase un bio marqueur de neurotoxicité (au niveau cérébral) et d'autre part par l'exploration de l'ultra structure du système neurosensoriel de la ligne latérale du poisson. Les concentrations létales sont égales à 10-20 µg/l de cadmium. Les résultats des dosages montrent que les teneurs des bio marqueurs varient en fonction de la dose et de la durée d'exposition au cadmium. L'exposition des poissons à des doses de 5 µg/l de cadmium induit une activation du système de détoxification qui se traduit, à partir du 7^{ème} jour d'exposition, par la diminution du taux de GSH et l'augmentation de l'activité de la GST. L'activité de la GST hépatique présente une différence significative et très significative chez les poissons exposés pendant 15 jours aux doses respectives de 1 µg/l et 5 µg/l de cadmium. Quant à l'acétylcholinestérase, affiche un taux d'inhibition très significatif chez les poissons exposés à 5 µg/l pendant 15 jours. L'observation des coupes fines des pièces prélevées de la ligne latérale de la tête des *Gambusia* traitées au cadmium ne montre pas des modifications anatomiques de l'organisation ultra structurale des cellules sensorielles. Ces résultats suggèrent que l'effet neurotoxique du cadmium pourrait être due à son action oxydative générant un phénomène radicalaire (ROS : reactive oxygen species) et altérant de ce fait l'activité des enzymes antioxydantes et notamment celle de l'Ache.

Mots clés : Acétylcholinestérase, GSH, GST, mécanorécepteurs, cadmium, *Gambusia affinis*.

Abstract

In this experimental study we were interested in cadmium, a heavy metal frequently met in the aquatic ecosystems. This work aims at evaluating the impact of cadmium, diluted at 1 and 5 µg/l in the water of various batches of *Gambusia affinis*, by the measuring the activity of some biomarkers of oxidative stress: the reduced glutathione (GSH) and the glutathione-S-transferase (GST) in a liver and the activity of cerebral acetylcholinesterase (AChE). The lethal concentrations are equal to 10-20 µg/l. The results show that the levels of biomarkers fluctuate according to the concentration and the exposure period to cadmium. The exposure of fish to 5 µg/l of Cd induce activation of the detoxification system which is revealed, as from the 7th day of exposure, by the reduction in the contents of hepatic GSH and increase GST activity. The GST activity presents a significant difference in fish exposed during 15 days to the respective concentrations 1 µg/l and 5 µg/l of Cd. As for the acetylcholinesterase, cadmium treatment induced a significant inhibition in brain AChE activity from 15 days exposure at 5 µg/l. while no effect of Cd treatment on ultra structural organisation of neurosensorial epithelium system. The data suggest, that the neurotoxic effect of cadmium may be induced through the oxidative pathway, by producing a free radical phenomena witch can altered the activity and the function of scavenger enzymes, like as inhibition cerebral acetylcholinesterase activity.

Keywords: Acetylcholinesterase, GSH, GST, mechanoreceptors, cadmium, *Gambusia affinis*.

Y. GASMI¹
K. OUALI¹
R. ROUACHDIA¹
W. KATI¹
J. P. DENIZOT²
M. BENSOUILAH¹

¹Laboratoire d'Ecobiologie des Milieux Marins et Littoraux, Faculté des Sciences ; Université Badji Mokhtar d'Annaba BP 12 El Hadjar Annaba 23000 Algérie.

²Laboratoire de Neurophysiologie Sensorielle Comparée, Centre d'Etudes de Physiologie Nerveuse, C.N.R.S., Paris, France.

ملخص

تهدف هذه الدراسة التجريبية إلى إيضاح تأثير الكاديوم (Cd) المنتشر في معظم الأنظمة البيئية المحيطة بالمناطق العمرانية و الصناعية. الهدف من هذا العمل هو تقييم تأثير تركيزين من الكاديوم : 1 µg/L و 5 µg/L على أسماك و ذلك عن طريق الكشف عن غدة إنزيمات دالة على توتر تأكسدي و خلوي GSH و GST في الكبد و Ach إنزيم يعبر عن سمية المادة في الجهاز العصبي الحسي للسمكة. النتائج تدل على تغييرات في الفعالية الإنزيمية مرتبطة مع تركيز و مدة المعالجة. ظهر ارتفاع في حساسية النظام الإنزيمي المضاد للسمم عند المعالجة بتركيز 5 µg/L و هذا مترجم بارتفاع نسب GSH و GST بعد سبعة أيام من المعالجة، كما توضح النتائج تثبيط فعالية إنزيم Ach لدى الأسماك المعالجة بـ 5 µg/L لمدة 15 يوما. ملاحظة العينات المأخوذة من الجهاز العصبي الحسي الرأسي للأسماك بالمجهر الإلكتروني لم تكشف عن تأثير الخلايا العصبية الحسية. كما توضح النتائج أن المفعول السمي العصبي للكاديوم يكون عن طريق مفعول تأكسدي ناتج عن زيادة في تركيز الجذور الحرة و تثبيط إنزيم Ach كونه العامل الهام في نقل السيالة العصبية.

الكلمات المفتاحية : مستقبلات ميكانيكية، HSG، TSG، E Ach، كاديوم

Contrairement à de nombreux métaux (cuivre, zinc, fer...), le cadmium n'a aucun rôle métabolique connu et ne semble pas biologiquement essentiel ou bénéfique au métabolisme des êtres vivants [1]. Mais c'est en revanche un xénobiotique placé sur la liste noire de la plupart des conventions internationales de pollutions du fait de sa cytotoxicité, sa génotoxicité, son potentiel de bioaccumulation et sa persistance [2]. Le cadmium atteint les milieux aquatiques par la voie atmosphérique ou par lessivage des sols et rejets directs anthropiques [3].

En matière de surveillance des écosystèmes il est plus pertinent de prévenir les effets de polluants sur la santé des organismes et des écosystèmes plutôt que de les constater a posteriori. De ce fait, les analyses biologiques, qui intègrent les interactions entre tous les polluants présents et les organismes, permettent de fournir un diagnostic plus réaliste de l'impact de la pollution sur les organismes qui peuplent les écosystèmes.

Les biomarqueurs présentent ainsi l'intérêt de pouvoir détecter des interactions polluant/organismes rapidement après exposition, et dans certains cas, de prédire des effets toxiques potentiels.

L'acétylcholinestérase (AChE) considérée comme étant un biomarqueur en puissance de l'état des fonctions neurologiques, est une enzyme qui hydrolyse l'acétylcholine, neurotransmetteur impliqué dans la transmission cholinergique [4,5,6]. L'inhibition de l'AChE induite par xenobiotiques conduit à une accumulation d'acétylcholine au niveau des synapses cholinergiques, phénomène susceptible de provoquer des perturbations comportementales affectant plus particulièrement la locomotion et l'équilibre [7,8].

Des effets des carbamates sur les neurotransmetteurs cérébraux (noradrénaline, dopamine et sérotonine) ont également été montrés [9]. Cependant, Les relations entre les impacts neurochimiques et comportementaux des métaux lourds, et en particulier le cadmium, ont surtout été étudiées chez les oiseaux [10,11,12] mais peu chez les poissons [13,14]. L'exposition de poissons au cadmium inhibe l'activité de la nage et réponses attirance/évitement [15,16]. Ces modifications comportementales sont associées à des déficiences sensorielles des systèmes olfactifs acoustico-latéral de poissons [17].

Dans ce contexte, nous avons opté pour étudier l'impact d'une agression chimique induite par le cadmium chez un poisson prédateur de larves de moustiques *Gambusia affinis* sur la transmission cholinergique par le dosage de l'acétylcholinestérase et l'intégrité du système de la ligne latérale par l'étude ultra structurale des mécanorécepteurs.

MATERIEL ET METHODES

Matériel biologique : *Gambusia affinis* est un poisson Téléostéen extrêmement robuste et rustique qui s'adapte bien à toutes sortes de qualités d'eau, des eaux douces aux eaux saumâtres. Les poissons utilisés dans cette expérimentation sont pêchés dans l'oued Kherraza (Annaba, algérie) ; ils sont placés dans des aquariums d'une capacité de 75 litres recevant une alimentation en eau de ville filtrée (500ml/min; 15-20°C). Les poissons ont été soumis à une photopériode de 12h de jour/ 12h de nuit (illumination de 7h30 à 19h30) et nourris 2 fois par jour (à 10h00 et 16h00) avec des granulés (Tetramin, France).

Protocole expérimental : Le choix des doses de cadmium utilisées dans cette expérience est basé sur des données de toxicité aiguë rapportées dans la littérature (0,5 µg/l à 10 µg/l). Dans nos conditions d'exposition (pH = 8,86; Température = 25°C), la dose létale est de 10 µg/l et les doses sublétales sont de 0,1 µg/l à 5 µg/l. Les poissons utilisés sont tous de sexe femelle, mature pesant en moyenne 3.5 ± 0.75 g. Ils sont répartis à raison de 60 spécimens par lots dans 4 aquariums, dont un servira de témoin et ne sera donc pas traité. Après une semaine d'acclimatation, la moitié de l'eau contenue dans chaque aquarium est renouvelée et le cadmium est introduit aux doses permettant d'obtenir les concentrations finales de 1 µg/l et 5 µg/l. Les temps d'exposition au xénobiotique sont de 7j, 15j et 21 jours.

Préparation de l'homogénat et mesures des activités enzymatiques : Après anesthésie à l'éther, selon la méthode de Vivien [18], l'hépatopancréas et le cerveau sont prélevés, pesés à l'aide d'une balance de précision (Sartorius de précision 1/10 mg) et maintenus à basse température. Les hépatopancréas de chaque lot sont poolés à raison de 100 mg et broyés dans du tampon phosphate sodique saccharosé à pH 6.5. L'homogénat est centrifugé à 5000 tours/minute pendant 15 minutes; le surnageant obtenu est récupéré pour servir aux dosages des protéines totales [19], du glutathion réduit [20] et l'activité de la GST [21].

Mesure neurochimique : L'activité de l'AChE du cerveau des gambusies a été mesurée après 7 et 15 d'exposition au cadmium en concentrations sublétales (1 et 5 µg/l). Les poissons ont été exposés par groupe de 5 dans des aquariums de 75l. Des groupes témoins eau et solvant (acétone 5µl/l) ont également été constitués.

Au terme de chaque période d'exposition, les cerveaux ont été rapidement prélevés et congelés. Après extraction dans du tampon "High Salt Triton" (HST) (Tris-HCl pH 7,5 20mM, NaCl 1M, Triton X-100 1%, bacitracine 0,1mg/ml, aprotinine 25u/ml, benzamidine 1mM, EDTA 5mM) et centrifugation (12000g), l'activité de l'AChE a été mesurée par spectrophotométrie à 412nm selon la méthode d'Ellman [22]. Les résultats ont été exprimés en pourcentage

d'inhibition de l'activité de l'AChE par rapport aux animaux témoins.

Microscopie électronique : Les fragments de la tête de poissons traités et non traités sont prélevés sous glace et immédiatement fixés par immersion dans une solution de glutaraldehyde à 2% dans un tampon phosphate 0,05M pendant une nuit à 4°C. Après lavage, les fragments sont ensuite post fixés par immersion dans une solution d'acide osmique à 2% dans le même tampon, pendant une heure à 4°C. Après lavage au tampon phosphates 0,05M, les pièces sont déshydratées, puis incluses dans une résine epoxy (spurr). Par la suite, l'épiderme est débité à l'ultra microtome en coupes fines de 800Å. Les coupes sont récupérées sur des grilles de cuivre puis contrastées à l'acétate d'uranyl et au citrate de plomb [23] pour être observées au microscope électronique à transmission (Phillips CM10).

Analyse statistique : L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide d'un logiciel d'analyse et de traitement des données (Minitab 4.1, eds, 2004). Les résultats sont exprimés en moyennes plus au moins l'écart type et ont été comparées par ANOVA à une voie et le test t de Tukay.

RESULTATS

Réponse des biomarqueurs

L'activité de l'AChE chez les poissons témoins n'a pratiquement pas varié (2,5-3,1 nmol/min/mg protéines) au cours des 21 jours d'expérimentation. Cependant l'activité de l'Acétylcholinestérase cérébrale chez les poissons traités révèle une diminution, avec un taux d'inhibition significatif de 19% à 33 % seulement chez les poissons exposés à la forte dose de cadmium 5 µg/l pendant 15 et 21 jours en comparaison aux poissons du lots témoin (T vs 5µg/l, p < 0,01 à 15 j et p < 0.001 à 21j) (Fig.1).

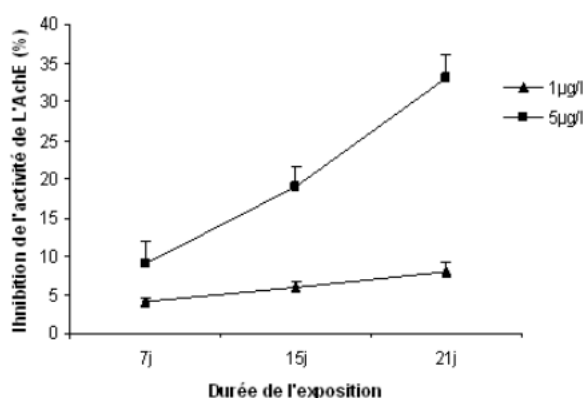


Figure 1 : Inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase dans le cerveau de *Gambusia affinis* après 7, 15, 21 jours d'exposition au cadmium à raison de 1 et 5µg/l (pourcentage par rapport au contrôle). Chaque point est la moyenne ± erreur type (p < 0.01 vs T et p < 0.001 vs T ; n = 10).

Les teneurs en GSH hépatique varient en fonction de la dose et de la durée d'exposition (Fig.2). Les poissons exposés au cadmium présentent des différences

significatives aux doses 1µg/l et 5µg/l pour des durées d'exposition respectives de 15 jours et de 7 jours (T vs 1µg/l, p < 0,05 à 15j ; T vs 5µg/l, p < 0,05 à 7j). Toutefois, des différences très significatives sont notées à partir de 21 jours d'exposition à la dose de 5µg/l (T vs 5µg/l, p < 0,01 à 21).

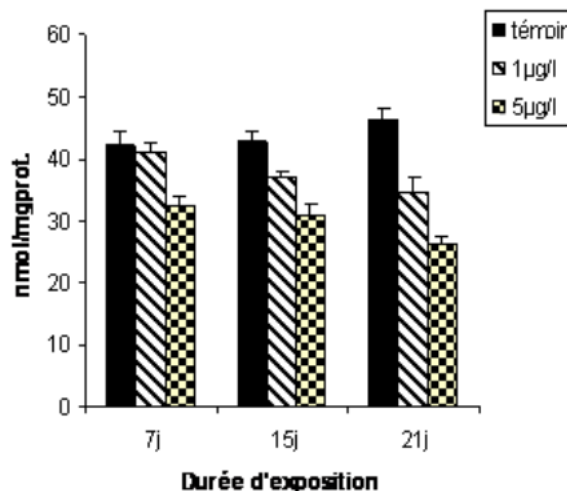


Figure 2 : Teneur en GSH hépatique en nmol/mg protéine chez *Gambusia affinis* exposée au cadmium à 1 et 5µg/l pendant 21 jours (p < 0.05 vs T et p < 0.01 vs T, n = 10).

L'activité de la GST hépatique dépend de la dose de cadmium à laquelle les poissons ont été exposés et de la durée d'exposition (Fig.3). Cette dernière montre une différence significative chez les poissons exposés à la dose intermédiaire 1µg/l de Cd à partir 15^{ème} jours (T vs 1µg/l, p < 0,05 à 15 et 21). En revanche, à la dose de 5 µg/l l'activité de la GST hépatique est significative à 7 jours de traitement (T vs 5µg/l, p < 0,05 à 7 jours) et très significative après 15 jours d'exposition (T vs 5µg/l, p < 0,01 à 15 et 21).

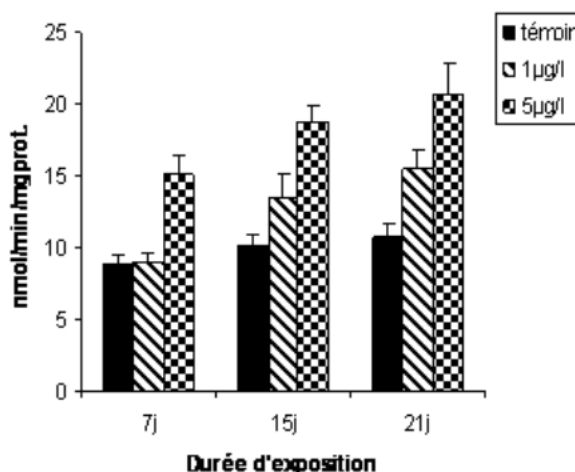


Figure 3 : Activité de la GST hépatique chez *Gambusia affinis* exposée au cadmium à 1 et 5µg/l pendant 21 jours (p < 0.05 et p < 0.01 vs T. n = 10)

Ultra structure de l'épithélium sensoriel : L'analyse de l'épithélium des mécanorécepteurs de la ligne latérale de la tête de *Gambusia affinis* traité par le cadmium à raison de 5 µg/l en microscopie électronique, montre une organisation anatomique normale de l'épithélium, des cellules sensorielles et accessoires. En effet après traitement la partie apicale des cellules sensorielles présente toujours sa cohorte de microvillosités (mv) et son kinocil qui ont été directement au contact de agents chimique testé. De plus, le traitement est encore sans effet sur le système d'innervation de ces cellules à fonction mécano réceptrice puisque la base de la cellule sensorielle (SC) reste au contact de terminaisons nerveuses de fibres sensorielles (af fibre afférente) et motrices (m) (Fig.4).

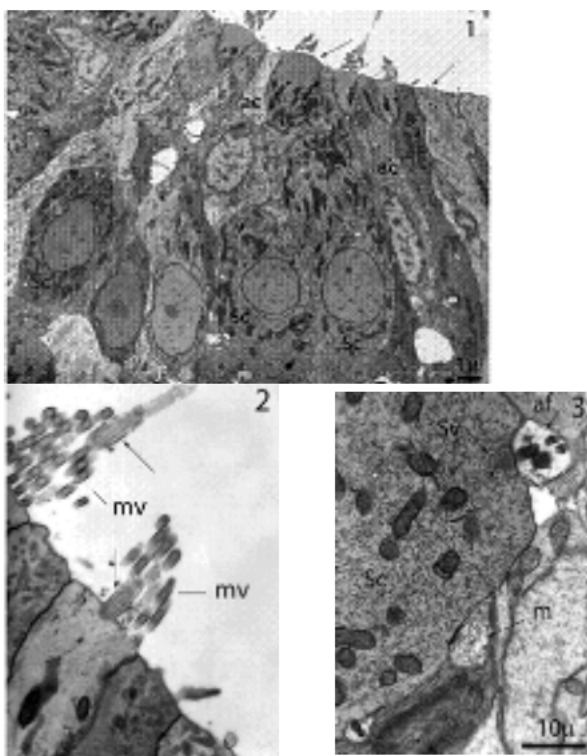


Figure 4 : Analyse de l'épithélium des mécanorécepteurs de la ligne latérale de la tête de *Gambusia affinis* traité par le Cd à raison de 5 µg/l en microscopie électronique. **fig.4.1.** Vue générale montrant la répartition des cellules sensorielles (SC) et des cellules accessoires (AC) constituant l'épithélium des mécanorécepteurs. La partie apicale de ces cellules (flèches) est au contact du milieu aquatique. (X 2750). **fig.4.2** agrandissement de la partie apicale des cellules sensorielles montrant la présence d'une cohorte de microvillosités (mv) et du kinocil (flèches). X 13400. **fig.4.3** agrandissement de la zone d'innervation des cellules sensorielles. La base de la cellule sensorielle (SC) reste au contact de terminaisons nerveuses de fibres sensorielles (af fibre afférente) et motrices (m). Dans le cytoplasme de la cellule sensorielle, noter, devant le bouton nerveux sensoriel, la présence d'un ruban synaptique (flèche) entouré de vésicules synaptiques (sv). X 13400.

DISCUSSION

Les résultats du dosage de la teneur en GSH et de l'activité de la GST chez les lots de poissons *G. affinis* traités au cadmium font apparaître des variations en fonction de la dose et de la durée d'exposition au métal.

Nous observons chez les gambusies exposées à la forte dose en cadmium une augmentation significative de l'activité de la GST alors que la concentration en GSH diminue significativement par rapport au témoin. La diminution du GSH peut s'expliquer par le fait que devant ce type de toxicité, le foie ne parvient pas à éliminer une concentration aussi accrue de métabolites toxiques [24]; Quant à l'augmentation de l'activité de la GST, elle correspond à l'augmentation de la capacité de détoxification du foie pour palier à l'invasion de l'organisme par le cadmium via la conjugaison du groupement thiol du glutathion réduit aux protéine par la GST. Mumtaz *et al.*, [25], signalent une augmentation de l'activité de la GST hépatique et cérébrale suite à une injection de cadmium à des cochons d'inde. Les résultats obtenus confirment les capacités du cadmium à générer des effets radicalaires cellulaires à divers niveaux métaboliques. Ce métal grâce à son pouvoir oxydant et sa capacité à interférer avec les groupements thiols intracellulaires, engendrerait, selon certains auteurs, la formation de complexes mixtes aberrants protéines - protéines ou protéines - glutathion [26,27].

La toxicité du cadmium rapportée chez de nombreux organismes aquatiques porte surtout sur de nombreux paramètres physiologiques qui dépendent des espèces testées et des conditions expérimentales [1].

Le cadmium peut réduire la survie d'organismes tels que l'amphipode *Gammarus fossarum* et même entraîner leur mort lorsqu'ils sont exposés à une concentration de cadmium de 1 mg/l [28]. Le cadmium peut aussi stimuler la métamorphose de larves du polychète euryhalin *Capitella sp.* à des concentrations de 1 à 2 mg/l [29]. Chez les oursins, le cadmium, à des concentrations du sédiment solide supérieures ou égales à 2 g/l, peut affecter le processus de l'embryogenèse de *Paracentrotus lividus* [30] et peut aussi affaiblir le pouvoir reproducteur de *Strongylocentrotus intermedius* à des concentrations de cadmium comprises entre 0,05 et 0,1 mg/l à travers une diminution de la qualité des gamètes [31]. Le cadmium peut aussi entraîner la mort de différents organismes; Ramachandran *et al.* [32] rapportent des DL50 à 48H de 0,312 µg/ml chez des larves d'oursin *Diadema setosum* (malformations) et de 0,078 µg/ml chez des larves de crabe *Scylla seratta* (mortalités). De plus, une mortalité importante (40%) a été observée chez des larves de copépode *Tigriopus brevicornis* après 8 jours d'exposition à des sédiments pollués [30]. Chez *Carassius auratus* exposé à 20 mg/l de cadmium pendant 15 jours, Zikic *et al.*, [33] rapportent une augmentation de l'activité des deux enzymes (SOD et CAT) au niveau des érythrocytes et une altération tissulaire des poissons. Chez les Epinoches adultes males et femelles, l'exposition au cuivre pendant 21 jours a engendré une diminution de l'activité du CAT dès le 8^{ème} jour d'exposition [34].

Il est intéressant de noter que la réponse des défenses antioxydantes précède l'accumulation du métal dans le foie qui n'est visible qu'à partir de 7 jours à la forte dose. Le décalage temporel entre les réponses antioxydantes et

l'accumulation du métal va dans le sens d'une implication de ces premières dans la régulation/détoxification de ce métal et de son impact oxydant, avant qu'il ne s'accumule. Il est probable que d'autres mécanismes de défense, comme les métallothionéines, soient mis en jeu.

Les résultats de la mesure de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) chez les gambusies exposés au cadmium font apparaître que l'activité de cette enzyme montre une inhibition significative chez les poissons exposés à 5µg/l pendant plus de 15 jours. Il en ressort que des expositions sublétales au cadmium, peuvent affecter significativement l'activité de l'AChE chez *Gambusia affinis* et que le cadmium semble agir de manière dose et durée dépendante puisque l'inhibition de l'AChE augmente avec la concentration et la durée d'exposition. Toutefois l'activité de l'AChE dans le cerveau de *Gambusia* se présente comme un marqueur d'exposition peu sensible au cadmium puisque des effets (19% d'inhibition) surviennent à 15 jours d'exposition en réponse à la plus forte concentration testée (5µg/l), contrairement aux autres xenobiotiques (insecticides carbamates et organophosphorés) leurs effet d'inhibition de 21% surviennent en réponse à la plus faible concentration testée (25µg/l), valeur très inférieure aux concentrations létales (CL50-96h: 0,5-1mg/l) déterminées chez les Cyprinidae [4,7,35]. D'après Amiard [36], la mesure de l'activité de l'AChE a surtout été utilisée comme biomarqueur pour d'autres xénobiotiques tels que les pyréthroides (utilisés dans les produits domestiques de la lutte contre les insectes) et accessoirement pour les métaux lourds.

L'étude de l'ultra structure de l'épithélium des mécanorécepteurs de ligne latérale de la tête des gambusies révèle que le traitement au cadmium à la dose 5µg/l ne semble pas affecter l'organisation et l'anatomie des cellules sensorielles. Néanmoins l'étude récente de Faucher [17] sur le système latéral du bar, *Dicentrarchus labrax* exposé au cadmium à 5µg/l a montré une altération de la structure des mécanorécepteurs accompagnée effet inhibiteur sur la réponse de fuite des poissons au danger ; toutesfois, Cet auteur signale une régénération des tissus des neuromastes et rétablissement du comportement de fuite après 21 jours de traitement.

Ces résultats suggèreraient que les neuromastes de *Gambusia affinis* seraient moins sensibles à ces teneurs en cadmium que ceux du bar. Il serait néanmoins intéressant Ceci conforte relativement nos résultats obtenus de l'étude ultra structural de l'épithélium sensoriel d'entreprendre simultanément, des études comportementales et physiologiques, chez *Gambusia*, exposé au cadmium et au cuivre. Pareilles études, en plus d'aider à déterminer la concentration seuil capable d'altérer le fonctionnement du système de la ligne latérale de cette espèce en conditions d'exposition chronique, pourrait aider à comprendre si la modification comportementale est en relation directe avec le dysfonctionnement des mécanorécepteurs de la ligne latérale [37] ou bien serait liée à une réponse neurotoxique générale au cadmium [38].

Compte-tenu des risques de contamination du milieu aquatique par le cadmium et du manque de données relatives à ses effets toxiques sublétaux chez le poisson, des travaux permettant de préciser les impacts physiologiques, biochimiques et comportementaux de ce métal en particulier et des métaux lourds en général doivent être poursuivis.

REFERENCES

- [1]- J.F.Chiffolleau, J.L.Gonzalez, P. Miramand, & B.Thouvenin, . Le cadmium: comportement d'un contaminant métallique en estuaire. Programme scientifique Seine-Aval 10 (1999): 31 p.
- [2]- D. Taylor, The significance of the accumulation of cadmium by aquatic organisms. *Ecotox. Environ. Saf.* 71(1983) : 33-42.
- [3]- P. Miramand, T. Guyot, J. Pigeot, P.Bustamante, F. Caurant, & R. Ferchaud, Le cadmium dans les réseaux trophiques marins : de la source aux consommateurs. *Journal Européen d'Hydrologie* 31 (2) (2000): 127-143.
- [4]- D.M. Trotter, R.A. Kent & P. Wong. Aquatic fate and effect of carbofuran. *Critic. Rev. Environ. Contr.*, 21(1991): 137-176.
- [5]- C.E.Grue, P.L. Gibert & M.E. Seeley, Neurophysiological and behavioral changes in nontarget wildlife exposed to organophosphate and carbamate pesticide: Thermoregulation, food consumption and reproduction. *Am. Zool.*, 37(1997): 369-388.
- [6]- A.G.HEATH, J.J. Jr.CECH, L. BRINK, P. MOBERG & J.G. ZINKL, Physiological responses of fathead minnow larvae to rice pesticides. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 37(1997): 280-288.
- [7]- J.G.ZINKL, W.L. LOCKHART, S.A. KENNY, & F.J. WARD, The effects of cholinesterase inhibiting insecticides on fish. *In: Cholinesterase-Inhibiting Insecticides* (Mineau P., ed.),(1991) 233-254. New York: Elsevier.
- [8]- P.SAGLIO, S. TRIJASSE & D. AZAM, Behavioral effects of waterborne carbofuran in goldfish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 31(1996): 232 -238.
- [9]- K.GOPAL & M. RAM, Alteration in the neurotransmitter levels in the brain of the freshwater snakehead fish (*Channa punctatus*) exposed to carbofuran. *Ecotoxicology*, 4(1995) : 1-4.
- [10]- D.J. FORSYTH & P.A. MARTIN, Effect of fenitrothion on survival, behavior, and brain cholinesterase activity of white-throated sparrows (*Zonotrichia albicollis*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 12(1993): 91-103.

- [11]- A.D.M. HART, Relationships between behavior and the inhibition of AChE in birds exposed to organophosphorus pesticides. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12(1993) : 321-336.
- [12]- S.L. FRIDAY , A.D.M. HART & S.D. LANGTON, Effects of exposure to an organophosphorus pesticide on the behavior and use of cover by captive starlings. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15(1996):1590-1596.
- [13]- H.DUTTA, J. MARCELINO & C. RICHMONDS, Brain acetylcholinesterase activity and optomotor behavior in bluegills, *Lepomis macrochirus* exposed to different concentrations of diazinon. *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys.*, 100(1992): 331-334.
- [14]- D.D.PAVLOV, G.M.CHUIKO, Y.V.GERASSIMOV and V.D. TONKOPIY, Feeding behaviour and brain acetylcholinesterase activity in bream (*Abramis brama* L.) as affected by DDVP, an organophosphorus insecticide. *Comp. Biochem. Physiol.*, 103C (1992) : 563-568.
- [15]- E. Yorulmazlar, A.Gül. Investigation of acute toxicity of cadmium sulfate (CdSO₄ x H₂O) and behavioral changes of grass carp (*Ctenopharyngodon*). *Chemosphere*, Volume 53 (2003): 1005-1010.
- [16]- G.R.Scott, K.A. Sloman, C. Rouleau and C.M. Wood. Cadmium disrupts behavioural and physiological responses to alarm substance in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J.Exp. Biol.*, 206 (2003): 1779-1790.
- [17]- K.Faucher, Le système latéral du bar, *Dicentrarchus labrax*, et conséquences d'un dysfonctionnement sur son comportement : action potentielle des ions métalliques. *Cybiuim* 29 (2) (2005):118.
- [18]- J.H.Vivien, Rôle de l'hypophyse dans le déterminisme de l'évolution et l'inversion sexuelle chez les xephophorue. *J. Physiol.*, 44(1941): 349-351.
- [19]- MM.Bradford. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72(1976): 248-254.
- [20]- G. Weckbeker et J.G. Cory, Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione depleted mouse leukemia L 1210 cells *in vitro* cancer. *Letters*, 40(1988):257-264.
- [21]- W.H. Habig, M.J. Pabst, et W.B. Jakoby , Glutathione-s-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The journal of biological chemistry* 249(1965):7130-7139.
- [22]- G.L.Ellman, K.O.Courtney, V.Andress, R.M.Featherstone, A new rapid colimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7(1961):88-95.
- [23]- E.S Reynolds ,use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy, *J. Cell. Biol.* 17 (1963), pp. 208–212.
- [24]- S.Kojima, H.Shimomra, S. Matsumoi ,Effect of irradiation with low dose gamma-rays on chemically induced hepatotoxicity and glutathione depletion. *Anticancer Res*, 20(3A)(2000): 1583-8.
- [25]- I.Mumtaz, C.Tualy et C.E.Benay, Differential combined effect of cadmium and nickel on hepatic and renal Glutathione-S-transferases of the *Guinea pig*. *Environ. health perspect.* 102 (suppl. 9)(1994): 69-72.
- [26]- R.K.Singhal, M.E.Anderson et A.Meister, Glutathione, a first line of defence against cadmium toxicity. *FASEB J.* 1(1987): 220-223.
- [27]- S.J. Stohs, et D. Bagchi, Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Rad. Biol. Med.* 18(1995): 321-336.
- [28]- T. Abel, et F.Barlocher, , Uptake of cadmium by *Gammarus fossarum* (Amphipoda) from food and water. *J. Appl. Ecol.* 25 (1)(1988): 223-231
- [29]- J.A.Pechenik, R. Berard, D. Daniels, T.R. Gleason et D.Champlin, Influence of lowered salinity and elevated cadmium on the survival and metamorphosis of trochophores in *Capitella* sp.. *Invertebr. Biol.* 120 (2)(2001): 142-148.
- [30]- C. Amiard-Triquet, Bioaccumulation et nocivité relatives de quelques polluants métalliques à l'égard des espèces marines. *Bull.Ecol.*, 20(2) (1998), 129-51.
- [31]- D.W.T.Au , A.A. Reunov, & R.S.S. Wu, Reproductive impairment of sea urchin upon chronic exposure to cadmium. Part II: Effects on sperm development. *Environ. Pollut.* 111(2001) : 11-20.
- [32]- S.Ramachandran, T.R. Patel et M.H. Colbo, Effect of copper and cadmium on three Malaysian tropical estuarine invertebrate larvae. *Ecotox. Environ. Safe.* 36(1997): 183-188.
- [33]- R.V.Zikic, A.S.Stajn, S.Z.Pavlovic, B.I.Ognjanovic, Z.S. Saicic. Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocytes and plasma transaminases of Goldfish (*Carassius auratus gibelio Bloch.*) exposed to cadmium. *Physiol.Res.* 50(2001): 105-111.

- [34]- W. Sanchez, O. Palluel, L. Meunier, M. Coquery, J.M Porcher and S. Aït-Aïssa. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environmental Toxicology and Pharmacology* (19) Issue 1, 2005. 177-183.
- [35]- M.H.Fulton, P.B. Key, Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 20(1) (2001): 37-4
- [36]- J.C.Amiard , Défense et illustration de l'écotoxicologie. *Journal de recherche océanographique* 15(3-4)(1990) : 92-95.
- [37]- MONTGOMERY, J.C., MCDONALD, F., BAKER, C.F. CARTON, A.G. and LING, N. Sensory integration in the hydrodynamic world of rainbow trout. *Proceedings: Biological Sciences* Volume: 270 Number: 1530 Supplement (2003) 2 195-197
- [38]- Fujita, I., P.W. Sorensen, N.E. Stacey, and T.J. Hara. The olfactory system, not the terminal nerve, functions as the primary chemosensory pathway mediating responses to sex pheromones in male goldfish. *Brain, Behavior and Evolution* 38(1991): 313-321.

