

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة البليدة 1

Université Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master 2 en :

Ecosystèmes aquatiques

Thème

Evaluation du stress chez des poissons d'eau douce : Tilapia rouge (*Oreochromis sp*) exposés à des résidus de pesticide à base de (l'oxyfluorène)

Soutenu par:

MmTIDAFI Naima

Mm Bekhti Souheyla

Devant le Jury :

<i>Mme Boulahya Imène</i>	<i>M A A</i>	<i>U.S.D. Blida-1</i>	<i>Présidente</i>
<i>Mme Djellouli Naima</i>	<i>M C B</i>	<i>U.S.D. Blida-1</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>Mme Belmeskine Hayet</i>	<i>M C A</i>	<i>U.S.D. Blida-1</i>	<i>Promotrice</i>
<i>Mr Meknachi Abdellah</i>	<i>Chercheur permanent</i>	<i>CNRDPA</i>	<i>Co-Promoteur</i>

Le 18 /07 /2019

REMERCIEMENTS

Avant tout, nous tenons à remercier notre bon Dieu qui nous a donné la patience, le courage et la force pour réaliser ce travail.

Au terme de ce mémoire, nous remercions tous ceux qui, par leur aide, leur compétence et leur disponibilité, ont contribué à son aboutissement. L'expérience acquise, tant sur le plan technique que sur le plan humain, nous a été très précieuse.

*Nous remercions vivement Mr. **ANNANERachid**, le directeur du CNRDPA qui nous a accueillies dans son établissement et nous a permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions. Notre Nos remerciements vont aussi aux membres du jury pour avoir accepté de juger notre travail : la présidente **M^{me} BOULAHYAImène**, maître assistante Aet l'examinatrice **M^{me} DJELLOULI Naima**, maître de Conférences B à l'université Blida1.*

*profonde gratitude s'adresse tout particulièrement à notre promotrice **M^{me} BELMESKINE Hayet**, maître de conférences A à l'université Blida 1, pour l'aide qu'elle nous a apportée, pour sa patience, sa confiance, son encouragement, et son œil critique qui nous ont été très précieux pour structurer le travail.*

*Notre profonde gratitude s'adresse tout particulièrement à notre Copromoteur Mr. **MEKNACHI Abdellah**, chercheur permanent au CNRDPA-Bou Ismail (W. Tipaza), pour ses précieux conseils et sa disponibilité, sa confiance dans l'élaboration de ce mémoire, qu'il trouve*

Ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

*Un grand merci à tous les membres de laboratoires physico-chimie : **Nabila, Yasmine, Lamia** pour leur aide, bonne humeur et de leur soutien.*

Merci à tous ceux qui nous ont aidé durant ce stage, de prêt ou de loin, et qui nous ont aidé à arriver à cette fin. Qu'ils trouvent ici l'expression de nos remerciements les plus vifs.

Merci à tous.

Dédicaces

Je dédie ce travail :

A mes chers parents, que Dieu les garde et les protège.

Je dédie ce travail spécialement à mes chères sœurs, la source du sourire dans ma vie, qui me donne l'espoir de vivre et de réussite dans mes études,

À mes frères, nièces et neveux

*Ainsi qu'à tous mes collègues et ami(e)s, en particulier **Laalia et Sid Ahmed***

Sans oublier tous ceux que je connais, que j'aime et que j'apprécie énormément leur aide et leur soutien, que je ne pourrai citer.



NAIMA

Dédicaces

*Je dédie ce travail à La lumière de mes yeux mes très chers parents; mon
père Ahmed qui s'est sacrifié pour me voir réussir,*

*A ma mère Aicha qui a veillé les nuits pour me voir grandir que Dieu me les
garde.*

A mon cher frère Mohammed.

A mes chères sœurs Fatima, Sabrina, Meriem, Ferial et Dallel

A mes belles nièces Jana et maria

A mon neveu Iyad

A toute ma famille

A tous mes amies spécialement Hamida et Siham

A tous ceux qui me connaissent de loin ou de près.



SOUHEYLA

Résumé

La présente étude a pour objectif d'évaluer le stress chez le poisson d'eau douce tilapia rouge (*Oreochromis*) exposées aux résidus de pesticides

Il s'est intéressée à un herbicide maracana dont la substance active est l'oxyfluorène, ce dernier est toxique de manière aiguë et chronique pour diverses espèces aquatiques et vise à évaluer l'impact de ce pesticide sur des poissons d'eau douce le tilapia rouge (*Oreochromis*) stockés dans des aquariums de 60*40*40 cm.

Notre travail s'est basé sur la dilution de différentes doses de ce pesticide (0,1 mg/l, 0,3 mg/l et 0,5 mg/l) dans l'eau de divers lots.

Des dosages enzymatiques (catalase, protéase) sont réalisés, en plus de la mise en évidence de l'influence de ce pesticide sur la biométrie et le métabolisme bioénergétique.

Les résultats des dosages montrent que l'exposition des poissons aux trois doses de ce polluant induit une perturbation du système antioxydant qui se traduit par une augmentation de l'enzyme catalase chez les tilapias exposés à l'oxyfluorène et la non réversibilité des mécanismes physiologiques pour le retour à l'homéostasie, et une inhibition de l'activité protéase qui mène à un ralentissement de la croissance surtout chez les tilapias exposés à des concentrations de 0,3 et 0,5 mg/l et de la reproduction avec un impact possible sur le maintien de la population.

Mots clé : oxyfluorène, tilapia rouge, catalase, protéase, biométrie, métabolisme bioénergétique

Abstract

Our experimental study investigated a maracana herbicide, the active substance of which is oxyfluorfen, which is acutely and chronically toxic to various aquatic species and aims to assess the impact of this pesticide on freshwater fish red tilapia (*Oreochromis* sp.) stored in aquariums of 60 * 40 * 40 cm.

Our work was based on the dilution of different doses of this pesticide (0.1 mg / l, 0.3 mg / l and 0.5 mg / l) in the water of various batches.

Enzymatic assays (catalase, protease) are performed, in addition to the demonstration of the influence of this pesticide on biometrics and bioenergetic metabolism.

The results of the assays show that the exposure of fish to the three doses of this pollutant induces a disturbance of the antioxidant system which results in an increase of the catalase enzyme in tilapia exposed to oxyfluorfen and the non-reversibility of the physiological mechanisms for return to homeostasis, and inhibition of protease activity which leads to slower growth especially in tilapia exposed to concentrations of 0.3 and 0.5 mg / l and reproduction with possible impact on the maintenance of the population.

Key words: Oxyfluorfen, red tilapia, catalase, protease, biometrics, bioenergetic metabolism

ملخص

حققتدر استنتا التجريبيية فيمبيداتالاعشابالماراكانا،والمادةالفعالةمنهاهيأوكسيفلوروفين،وهيشديدةالسميةوالمزمنةلمختلفالأنواعالما نية (وكالتهمايةالبيئةالأمريكية 2002 ، 2009) ،وتهدفإلنتقيمتأثيرهذاالمبيدعلأسماكالمايهالعذبةالبلطياالأحمر .المخزنةفيأحواضالسماك 60 * 40 * 40 سم (oreochromissp)

.استندعملناإلالتخفيفمنجرعاتمختلفةمنهذاالمبيد (0.1 ملغم / لتر، 0.3 ملغم / لتر و 0.5 ملغم / لتر) فيالمياهعلبدفعاتمختلفة

.يتمإجراءفحوصاتالأنزيمية (الكاتالاز،البروتياز) ، وإظهارتأثيرهذاالمبيدعلالقياساتالحيويةوالتمثيلالغذائالحيوي

تظهرنتائجفحوصاتالأنزيميةضالأسماكالجرعاتالثلاثلهذاالملوثيسبباضطرأبأفإنظاممضاداتالأكسدةممايؤديإلزيادةإنزيمالكاتالازفيالبلطياالمعرضةلأوكسيفلوروفينوعدمقابليةالآلياتالفسولوجيةللانعكاسالعودةإلالتوازن،وتثبيطنشاطالأنزيمالبروتينالذييؤديإلنتباط والنموخاصةفيالبلطياالمعرضلتركيزات 0.3 و 0.5 ملغم / لتروالتكاثرمعنأثيرمحملعلبالحفاظعلبالسكان

.الكلماتالمفتاحية: أوكسيفلوروفين،البلطياالأحمر،الكاتالاز،البروتياز،القياساتالحيوية،الأيضالحيوي

TABLE DE MATIERES

Remerciements

Résumés

Liste des figures

Liste des photos

Liste des tableaux

Abréviations

Sommaire

Introduction.....page 1

Chapitre I : Revue bibliographique

I.1. Biologie de l'espèce d'étude Tilapia rouge "*Oreochromis*"page 3

I.1.1. Systématique et morphologie Page 3

I.1.2. Biologie et écologiepage 4

I.1.2.1. Reproductionpage 5

I.1.2.2. Croissance page 5

I.1.2.3. Régime alimentaire page 5

I.1.2.4. Exigences écologiques.....page 5

I.1.3. Habitat et répartition page 6

I.1.4. Choix de l'espèce en écotoxicologie page 7

I.1.5. Outils d'évaluation en écotoxicologie.....page 7

I.2. Le stress chez les poissons page 8

I.2.1. Définition page 8

I.2.2. Système de défense antioxydante	page 8
I.2.3. Particularités de stress chez les poissons	page 9
I.2.4. Facteurs inducteurs de stress	page 10
I.2.5. Biomarqueurs de stress	page 12
I.3. Les pesticides	page 13
I.3.1. Définition	page 13
I.3.2. Classification des pesticides	page 14
I.3.3. Voies de contamination des écosystèmes	page 15
I.3.4. Contamination des eaux par les pesticides	page 15
I.3.5. Le pesticide étudié	page 16

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.1. Période et lieu de stage	page 19
II.2. Matériels utilisés	page 19
II.2.1. Matériel biologique	page 20
II.2.2. Matériel non biologique	page 20
II.3.Méthodes	page 21
II.3. 1. Test de toxicité de longue durée	page 21
II-3-2 Suivi et mesure des paramètres au cours des cycles expérimentaux	page 22
II-3-2-1- Paramètres physicochimiques (Eau d'élevage)	page 22
II-3-2-2 Paramètres biométriques	page 24
II-3-2-3 Paramètres bioénergétiques	page 25
II-3-2-4 Les mesures biochimiques	page 27
II-3-2-4-2 Homogénéisation des tissus Foie et intestin	page 28
II-3-2-4-3 Dosage de la protéase dans l'intestin	page 29

II-3-2-4-4 Dosages de la Catalase dans le foie	page 30
--	---------

Chapitre III : résultats et discussions

III. 1. Résultats des analyses physico-chimiques et bactériologiques de l'aliment et de l'eau d'élevage.....	page 31
III. 1.1. L'aliment	page 31
III. 1.2. Paramètres physicochimiques de l'eau d'élevage.....	page 32
III. 1.2.1. Température.....	page 32
III. 1.2.2. pH.....	page 33
III. 1.2.3. Étude de l'effet de l'oxyfluorène sur l'excrétion azotée et phosphorée.....	page 34
III.2. Étude de l'effet de l'oxyfluorène sur les paramètres bioénergétiques	page 36
III.2.1. Gain en poids journalier GPJ.....	page 37
III.2.2. Ration maximale R_{mx}	page 37
III.2.3. Ration quotidienne de maintenance R_{mt}	page 38
III.3. Étude de l'effet du polluant sur la biométrie.....	page 41
III.4. Résultats des analyses biochimiques	page 47
III.4.1. L'activité catalase	page 47
III.4.2. La protéase	page 49
Conclusion.....	page 51

Références bibliographiques

Annexes

INTRODUCTION

Au cours du siècle dernier, les activités anthropiques, poussées par les avancées technologiques, ont conduit à des augmentations des niveaux de contaminants organiques et inorganiques dans l'environnement. L'accumulation de ces polluants dans l'environnement aquatique peut causer une dégradation des écosystèmes en induisant une toxicité sur de nombreux organismes (**Livingstone, 1998**). Toutefois, l'agriculture est considérée comme une source importante de pollution des écosystèmes en raison de l'usage généralisé de pesticides pour protéger les cultures et améliorer leur rendement.

De ce fait, le gestionnaire manque d'informations sur l'urgence des mesures à prendre pour améliorer l'état de santé de ces écosystèmes, ou protéger la biodiversité et l'intégrité de ces derniers (**Flammarion *et al.*, 2000 ; Lagadicet *al.*, 1997,1998 ; Barillet., 2007 ; Casas, 2005 ; Nakhlé., 2003**)

Les stratégies de surveillance développées actuellement sont diverses; l'utilisation de mollusques fixés et de poissons relativement sédentaires est la plus couramment développée dans les programmes de surveillance environnementale. En effet, les moules et les poissons présentent des caractéristiques qui en font d'eux de bons bio indicateurs (**Casas, 2005 ; Amiard et Amiard, 2008**).

Les tilapias constituent le groupe de poissons qui a connu la plus forte croissance ces dix dernières années toutes espèces aquatiques confondues. Il est produit aujourd'hui dans plus de 100 pays avec un rythme élevé: ou 3,7 millions de production mondiale de Tilapia ont été enregistrés durant l'année 2010 (FAO, 2012).

D'autres stratégies d'utilisation des biomarqueurs sont largement étudiées et utilisés pour établir un diagnostic de l'état de dégradation des environnements aquatiques. En milieu naturel, les polluants sont généralement présents sous forme de mélanges complexes renfermant plusieurs catégories de contaminants. Si les polluants chimiques sont connus pour induire une réponse de biomarqueurs, les stress physiques et biologiques peuvent également modifier cette réponse.

L'objectif de l'étude est l'évaluation du stress chez des poissons d'eau douce tilapia rouge *Oreochromis sp.*, exposés à un herbicide contenant l'oxyfluorène comme substance active. Elle

INTRODUCTION

visent l'évaluation des paramètres biométriques et bioénergétiques ainsi que l'impact sur les biomarqueurs de stress oxydant tel que, la catalase et la protéase.

Pour répondre à cette problématique, nous allons réaliser une étude *in vivo* au niveau de CNRDPA sur l'exposition chronique de tilapia rouge à l'oxyfluorène.

Le présent travail comporte trois chapitres organisés comme suit :

- Le premier chapitre est consacré à la revue bibliographique dans laquelle sont présentées l'espèce d'étude, le stress et le pesticide visés par notre étude.
- Le deuxième chapitre est réservé à la présentation du matériel et méthodes
- Le troisième synthétise les résultats et la discussion de ces derniers.

I.1. Biologie de l'espèce d'étude *Tilapia rouge* "*Oreochromis sp*"

Le tilapia est un terme utilisé pour désigner un groupe de poissons de consommation, d'importance commerciale appartenant à la famille des cichlidae (**Chapman, 2000**), en particulier les espèces des trois genres *Tilapia*, *Sarotherodon* et *Oreochromis* (**Malcom et al., 2000**).

Le premier hybride de tilapia rouge appelé tilapia rouge taiwanais, a été obtenu à Taiwan, à la fin des années 1960, issu d'un croisement entre une femelle orange rougeâtre, *T. mossambica* et un mâle normal, *T. nilotica* (**Galman et Avtalion, 1983**).

En raison de leur biologie évolutive complexe, la classification et la dénomination des cichlides sont confuses et en constante modification.

I.1.1. Systématique et morphologie

Embranchement : chordata

Sous embranchement : vertebrata

Super classe : osteichthyes

Classe : actinopterygii

Sous classe : neopterygii

Super ordre : acanthopterygii

Ordre : Perciformes

Sous ordre labroidei

Famille : Cichlidae

Genre : *Oreochromis*

Espèce : *Oreochromis sp* [*oreochromis niloticus*] (**Linnaeus, 1758**), X *oreochromis mossambicus* (**Peters, 1852**)

- **La morphologie** : Les espèces de cette famille se reconnaissent par:

- Une forme trapue,
- Tête portant une seule narine de chaque côté,

- Os operculaire non épineux,

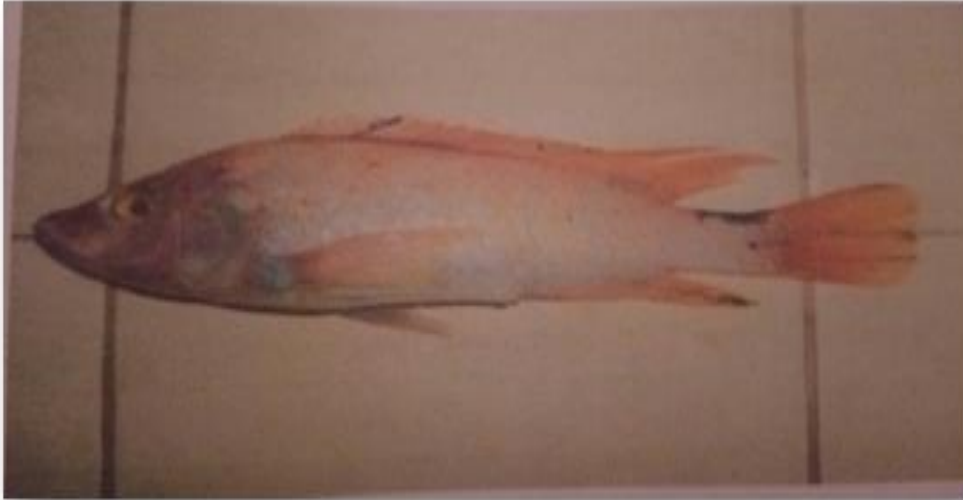


Photo 1 : Tilapia Rouge *Oreochromis sp* (CNRDPA, 2012) (originale).

- Corps comprimé latéralement, couvert essentiellement d'écailles cycloïdes et parfois d'écailles cténoïdes
- Longue nageoire dorsale à partie antérieure épineuse ;
- Nageoire anale avec au moins les 3 premiers rayons épineux ;
- Incubation buccale avec garde uniparentale maternelle.

En plus le Tilapia hybride ou rouge a un corps comprimé, avec une teinte soit de couleur grise, albinos, rose, rouge-orange (Moralee *et al.*, 2000) et des fois ayant des taches grise sur la poitrine

I.1.2. Biologie et écologie

Le tilapia est un poisson d'eau douce appartenant à la famille des Cichlidés. Les Cichlidae font partie des plus importantes ressources halieutiques des systèmes aquatiques continentaux en Afrique tropicale (Fryer et Iles, 1972) et sont de loin les plus abondants dans la faune ichthyologique continentale, avec près de 143 genres et 900 espèces (Lévêque et Paugy, 2006). Elles représentent une part importante des pêches artisanales continentales avec plus de 50% des captures annuelles (Ayoade et Ikulala, 2007). Ils sont originaires d'Afrique, mais ils

ont été introduits dans beaucoup de régions tropicales, subtropicales et tempérées du monde pendant la deuxième moitié du 20^{ème} siècle (**Pillay, 1990**).

En élevage, seul le genre *Oreochromis* est représenté par cinq espèces principales : *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis mossambicus*, *Oreochromis aureus*, *Oreochromis hornorum* et le tilapia rouge issue du croisement : *O.mossambicus* X *O.niloticus*.

I.1.2.1. Reproduction

Les tilapias sont connus par leur maturité sexuelle à une petite taille, environ 8-10 cm. *Oreochromis sp* est une espèce qui pratique l'incubation buccale (**Legendre et coutin, 1989**). Dans les régions tempérées, la saison de frai du tilapia commence habituellement pendant les mois de printemps, lorsque la température de l'eau augmente, soit supérieure à 22 ° C.

En milieu naturel, les nids pour le frai sont construits sous la forme de fosses peu profondes au fond de l'étang. Une fois que la femelle a libéré ses œufs et que la fécondation a eu lieu, la femelle les récupère et les incube dans sa bouche.

L'incubation, l'éclosion et les soins aux jeunes peuvent durer environ trois semaines. Après l'absorption du vitellus, les jeunes tilapias se nourrissent activement d'une alimentation variée, telle que plancton et détritus (**Chapman, 2000**).

I.1.2.2. Croissance

Le taux de croissance du tilapia est influencé par une variété de facteurs; température de l'eau, sexe, alimentation, et la densité de stockage (**Chapman, 2000**).

Dans les populations de tilapia, les mâles grandissent plus vite et ont une taille plus uniforme que les femelles. En fonction de son régime alimentaire, le tilapia peut atteindre la taille marchande de 400 g en 8 mois.

I.1.2.3. Régime alimentaire

Le tilapia est un poisson à croissance relativement rapide, son régime alimentaire est principalement basé sur l'utilisation de produits et de sous-produits végétaux ou d'aliments composés.

I.1.2.4. Exigences écologiques

Les tilapias sont plus tolérants, que les poissons d'eau douce les plus couramment élevés, à une salinité élevée, une température élevée de l'eau, une faible teneur en oxygène dissous et des concentrations élevées en ammoniac (**Pullin et lowe, 1982 ; Popma et Masser, 1999**).

I.1.2.4.1. Température : Les tilapias sont des poissons thermophiles et leur distribution géographique est étroitement déterminée par la température. Reflétant leur origine tropicale, la

Chapitre I : Revue bibliographique

température optimale pour l'activité biologique de la plupart des espèces de tilapia est comprise entre 25 et 28 ° C. En effet, sa reproduction s'interrompt à 22 ° C et ne se nourrit pas au-dessous de 15 ° C (**Malcolm et al., 2000**). Dans les conditions de laboratoire, *oreochromis sp*, tolère des températures jusqu'à 40 ° C (**Balarin et Hatton, 1979**).

I.1.2.4.2. Salinité : Plusieurs espèces de tilapias sont euryhalines, capables de vivre et se reproduire à des salinités supérieures à 30‰.

Les tilapias hybrides rouges ont une croissance et une grande tolérance pour les eaux salines. Cette tolérance varie par espèce et par âge (**Malcom et al., 2000**) de 0,015 et 30 %. La tolérance à la salinité des alevins de tilapia hybrides commence à augmenter 7 jours après l'éclosion.

I.1.2.4.3. Oxygène dissous : Les observations disponibles dans la nature et dans les étangs, les cages et les réservoirs suggèrent que les tilapias sont très résistants aux faibles niveaux d'oxygène dissous (OD) (**Balarin et Hatton, 1979**).

Le taux d'oxygène nécessaire pour *oreochromis sp* est de 3 mg/l et l'optimal est de 4 à 5 mg/l (**Malcom et al., 2000**).

I.1.2.4.4. Potentiel d'hydrogène : Pour les tilapias, les niveaux mortels inférieurs et supérieurs du pH sont 4 et 11 (**Chervinski , 1982**). Pour d'autres, le meilleur niveau pour la croissance est à pH neutre ou légèrement alcalin (**Popma et Masser , 1999 ; lovshin , 1998**).

La tolérance à la variation de pH est très grande puisque l'espèce se rencontre dans des eaux présentant des valeurs de pH allant de 5 à 11 (**Malcolm et al, 2000**) et le pH optimum varie de 8 à 11 (**Gorge, 1996**).

I.1.2.4.5. Composés azotés : Selon **Balarin et Hatton (1979)**, la concentration létale en NH₃-NH₄⁺ chez les tilapias est supérieure à 4 mg/L à pH 7,3 - 7,5.

I.1.3. Habitat et répartition

Le Tilapia est un poisson d'eau douce qui présente une répartition originelle strictement africaine couvrant les bassins du Nil ; du Niger ; des Volta et du Sénégal. Il a été introduit à des fins commerciales dans de nombreuses régions d'Asie comme, par exemple, l'Indonésie, la Malaisie, la Thaïlande et les Philippines. Actuellement, les tilapias sont cultivés dans le monde entier (production aquaculture). La famille des Cichlidae regroupe des poissons particulièrement adaptés aux eaux douces et saumâtres. Ils peuvent coloniser divers types d'habitats permanents ou temporaires, différents types de cours d'eau, de lacs, d'estuaires et de lagunes (**Trewavas, 1982**).

I.1.4. Choix de l'espèce en écotoxicologie

Les espèces de tilapia sont utilisées dans de nombreux travaux de recherche en toxicologie et écotoxicologie aquatique (Wu *et al.*, 2007 ; Aldoghachi *et al.*, 2016 ; Hagar, 2019 ; Nurulnadia *et al.*, 2018). En effet, ils sont reconnus pour leur maturité précoce, résistance aux maladies et à une large gamme de tolérance au sel et densité (Watanabe *et al.*, 1989 ; Vovener, 2012).

La majorité de ces études se sont focalisées sur le genre *Oreochromis* qui se caractérise par une relative tolérance aux polluants (Gadagbui *et al.*, 1996; Almeida *et al.*, 2002; Shailaja et D'Silva, 2003).

Le tilapia hybride rouge (*O. mossambicus* **O. niloticus*) a une popularité auprès des consommateurs en raison de ses caractéristiques favorables telles que la facilité de gestion de la culture et sa grande acceptabilité en tant que source de protéines.

I.1.5. Outils d'évaluation en écotoxicologie

L'évaluation du risque environnemental peut se faire au laboratoire, via des bioessais ou autres expérimentations.

Les bioessais sont réalisés au laboratoire, sous conditions contrôlées avec des modèles biologiques connus (ex : daphnie, poisson, etc.), pour observer les effets d'un polluant sur les traits d'histoire de vie d'un organisme (croissance, reproduction, survie) (Van der Oost *et al.*, 2003). Ces outils permettent de connaître les doses nocives d'un polluant pour cet organisme modèle. Ces tests de toxicité ou bioessais, se distinguent en deux types :

- Les tests de toxicité aiguë qui se réalisent sur une durée très courte. Leurs avantages sont leur rapidité et leur faible coût. Ces tests impliquent généralement des concentrations élevées du polluant; de ce fait, les effets à long terme des faibles concentrations ne sont pas mis en évidence.
- Les tests de toxicité chronique se déroulent sur une durée relativement longue. Ils sont plus longs et plus coûteux que les tests aigus, mais ils permettent de mettre en évidence des effets à long terme d'un polluant (Geffard , 2001 ; Geffard, 2001).

I.2. Le stress chez les poissons

I.2.1. Définition

Plusieurs définitions ont été données au terme stress. Selon (**Seyle, 1950**), le stress est la somme des réactions physiologiques par lesquelles un animal essaye de maintenir ou de restaurer son métabolisme normal quand il doit faire face à une force extérieure chimique ou physique (**Roberts, 1979**).

Il est défini aussi comme étant « *Réponse hormonale d'un organisme vivant provoquée par une perturbation de l'état physiologique normal au repos et de l'homéostasie de cet animal par des facteurs environnementaux ou extérieurs* » (**Bartelme, 2004**).

Cette réponse hormonale est à l'origine de changements d'ordre biochimiques, physiologiques et comportementaux destinés à protéger l'organisme d'une agression, au sens large du terme.

De plus, le stress oxydant est défini comme un déséquilibre de la balance oxydante, qui met en relation d'un côté les activités pro-oxydantes, et de l'autre les activités antioxydantes. Sans stress, cette balance est à l'équilibre, avec des activités pro-oxydantes naturelles, comme la respiration mitochondriale, parfaitement contrôlées par les activités antioxydantes (**Favier, 2003**). Cependant, de nombreux mécanismes et polluants peuvent faire pencher cette balance et donc créer un stress oxydant via une surproduction de ROS et une altération des fonctions antioxydantes.

Parmi les phénomènes précurseurs de ROS, la respiration mitochondriale est le plus important. Le terme d'espèces réactives de l'oxygène (communément appelées ROS en anglais) inclut les différentes formes actives de l'oxygène (comme le radical hydroxyle (OH^\bullet) ou l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$)) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ainsi que les espèces radicalaires qui peuvent en être les initiateurs (**Barillet, 2007**).

I.2.2. Système de défense antioxydante

De point de vue biologique, les antioxydants sont toutes substances qui, présentes à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retardent ou inhibent significativement l'oxydation de ce substrat et dont les produits de la réaction entre l'oxydant et l'antioxydant ne doivent pas être toxiques (**Zdenka, 2008**). Pour se protéger des effets délétères des ROS, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes (**Haleng et al.; 2007**), enzymatiques et non enzymatiques exogènes (**Tableau 1**).

Chapitre I : Revue bibliographique

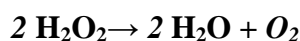
Tableau 1 : Systèmes antioxydants de l'organismes (Delattre *et al.*, 2005)

Systèmes antioxydants enzymatiques endogènes	Système antioxydants d'origine alimentaire
1. Superoxyde dismutase	7. Vitamine C
2. Catalase	8. Vitamine E
3. Glutathion peroxydase	9. Caroténoïdes
4. Glutathion réductase	10. Flavonoïdes
5. Lipase, protéase, endonucléases (éliminent les molécules oxydées)	11. polyphénols
6. Albumine, ferritine (complexent les ions divalents)	

Il nous semble important de rappeler ici que notre étude expérimentale vise deux composantes du système de défense enzymatique, soient :

➤ **La catalase (CAT):**

La catalase est une enzyme héminique capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Elle est essentiellement présente dans les peroxysomes, les érythrocytes, les hépatocytes et les reins (Hudson *et al*, 2005).



- **La protéase** : Les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines, en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique. Les protéases sont divisées en deux groupes selon leur site d'action, soit les protéases intracellulaires ou extracellulaires (KALISZ, 1988).

I.2.3. Particularités de stress chez les poissons

Selon (Pasnik *et al*, 2010 ; Weber, 2011), Le stress est un processus complexe, dynamique et graduel. Par souci de clarté, plusieurs types de stress, aux conséquences différentes sur l'organisme, ont été distingués : stress aigu ou chronique d'une part et stress intense ou modéré d'autre part. Si un facteur de stress est présent ou s'intensifie, la réponse du poisson

Passera par différentes phases :

Chapitre I : Revue bibliographique

- une réponse initiale comportementale rapide (quelques secondes à quelques minutes) qui vise pour le poisson, lorsque c'est possible, à se soustraire au facteur de stress par un comportement de fuite ou d'agression.

- une réponse primaire hormonale qui se traduit par la libération dans le flux sanguin de cortisol, d'épinéphrine et de norépinéphrine. Ces hormones stimulent le métabolisme général (augmentation du rythme cardio-respiratoire, mobilisation et redistribution des apports énergétiques aux différents organes).

- une réponse secondaire dont les conséquences portent sur la composition sanguine (hyperglycémie, acidose lactique), le métabolisme des glucides et des lipides ainsi que sur l'osmorégulation. Elle se met en place en quelques minutes à quelques heures en cas de stress de longue durée ou même chronique.

- une réponse tertiaire lors de stress chronique. Elle apparaît quelques heures après le début du stress. Elle se manifeste par des effets sur la nage, le comportement général (coloration, repli des nageoires, prostration, anorexie...), le métabolisme dans son ensemble, l'immunité, la croissance et la reproduction. C'est la forme de stress la plus facilement identifiable.

I.2.4. Facteurs inducteurs de stress

Nous retrouvons dans la littérature plusieurs dénominations pour qualifier ce terme : agents stressants, stresseurs ou stressors selon le terme anglo-saxon (**Bensabat, 1980 ; Boudarene *et al*, 1997**). Les facteurs de stress tels qu'on les définit dans la terminologie francophone, représentent l'ensemble des situations qui peuvent constituer des agressions ou qui sont vécues comme telles. Ils sont multiples et de différentes origines :

I.2.3.1. Origine abiotique : On peut séparer les stress abiotiques ; d'ordre physique ou chimique et les stress biologiques ou ressentis. Les stress physique sont liés à des modifications rapides ou au-delà des limites de tolérance de l'organisme des conditions abiotiques du milieu telles que la température, la pression osmotique ou encore l'oxygénation de l'eau.

Les stress chimiques sont généralement dus à une détérioration de la qualité de l'eau en raison d'une acidification du milieu ou de la contamination par des polluants. Les pressions exercées par les congénères, la prédation, le parasitisme ou encore les manipulations expérimentales (confinement, manipulation) sont considérées comme des stress biologiques.

I.2.3.2. Origine anthropique :

Les principaux facteurs de stress liés à l'activité de vente et susceptibles de dégrader la santé des poissons sont cités ci-dessous (**Crosby *et al.*, 2007 ; Brydges *et al.*, 2009 ; Floyd, 2009 ; Pasnik *et al.*, 2010 ; Pizzinat, 2012**).

a-Transport

- Confinement et densité lors du transport depuis le grossiste dégradent la qualité de l'eau,
- Un trajet de longue durée accentue la pollution de l'eau
- Présence éventuelle d'additifs dans l'eau de transport (antiparasitaires, antibiotiques, sédatifs...) qui perturbent les mécanismes d'osmorégulation et abîment les branchies.

b-Acclimatation

- Technique utilisée : présence de manipulations (des poissons à l'épuisette, au sac), pas d'équilibre progressif des qualités d'eau,
- Durée de l'acclimatation trop courte

c-Qualité de l'eau

- Cause la plus fréquente de mortalité et de maladies chez les poissons d'ornement,
- Paramètres physico-chimiques inadaptés ou trop différents,
- Pollution importante, forte biomasse, changements d'eau et nettoyage des masses filtrantes trop espacés, excès d'alimentation,
- Présence d'agents pathogènes favorisée par une hygiène insuffisante (nettoyage du fond des aquariums, ramassage des morts).

d-Pêche des poissons

- Utilisation d'une épuisette : l'extraction du milieu aquatique est considérée comme le stress le plus intense qui soit pour un poisson. De plus l'épuisette lèse la peau (pertes de mucus, perte d'écailles) et peut occasionner des blessures (peau, yeux, nageoires). Pêcher un poisson sans le sortir de l'eau, avec un récipient ou un sac en plastique transparent percé est moins stressant mais semble difficilement réalisable en pratique.

e-Gestion des populations de poissons

- Densité et nombre de poissons inadaptés : concurrence alimentaire, augmentation de l'agressivité de certaines espèces si densité trop faible comme chez les cichlides, besoin d'interactions sociales pour les espèces grégaires.
- Confinement trop important par rapport aux besoins des poissons.

f-Traitements

- Les traitements thérapeutiques peuvent se révéler stressants pour le poisson et doivent être raisonnés.

g-Alimentation

- la qualité de l'alimentation (peu souvent à l'origine de troubles dans les faits).

I.2.5. Biomarqueurs de stress

Les substances chimiques dispersées dans l'environnement représentent un risque pour les organismes vivants et la santé humaine.

Afin de préciser les risques potentiels d'une substance chimique il est important d'évaluer sa toxicité sur diverses espèces représentatives des écosystèmes aquatiques (effets sur la survie, la reproduction, la croissance etc.), pour cela des outils de diagnostic ont été développés.

Dans le domaine de l'environnement, un biomarqueur se définit comme : « *un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologiques ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant* » (Lagadic et al, 1997).

D'après (Gestel et Brummelen, 1996), le biomarqueur est défini comme toute réponse biologique à un contaminant chimique environnemental à un niveau infra-individuel, mesuré dans un organisme ou dans ses « produits » (urine, fèces, poils, plume, ...), indiquant un changement par rapport à l'état normal qui ne peut être détecté chez l'organisme sain (Fig.1)(Gaujous, 1995).

I.2.4.1. Les différents types de biomarqueurs: ils sont subdivisés en trois classes

- **Biomarqueurs d'exposition**: couvrant la détection et la mesure d'une substance exogène ou de son métabolite ou du produit d'une interaction entre un agent xénobiotique et une molécule ou cellule cible mesurée dans un compartiment de l'organisme,

- **Biomarqueurs d'effet**, y compris les altérations biochimiques, physiologiques ou autres, mesurables dans les tissus ou les fluides corporels d'un organisme, qui peuvent être reconnues comme étant associées à une altération de la santé ou à une maladie établie ou éventuelle,

- **Biomarqueurs de susceptibilité** indiquent la capacité inhérente ou acquise d'un organisme à répondre au défi de l'exposition à une substance xénobiotique spécifique, y compris des facteurs génétiques et des modifications des récepteurs qui modifient la sensibilité d'un organisme à cette exposition.

Les biomarqueurs peuvent être qualifiés selon deux critères (**Bonnomet *et al*, 2004**) :

- Soit **d'indices de stress généraux** traduisant une réponse de l'organisme à un ensemble de polluants sans permettre de déterminer la nature même de ces polluants.
- Soit **d'indices de stress spécifiques** indiquant une réponse de l'organisme à une famille de polluants.

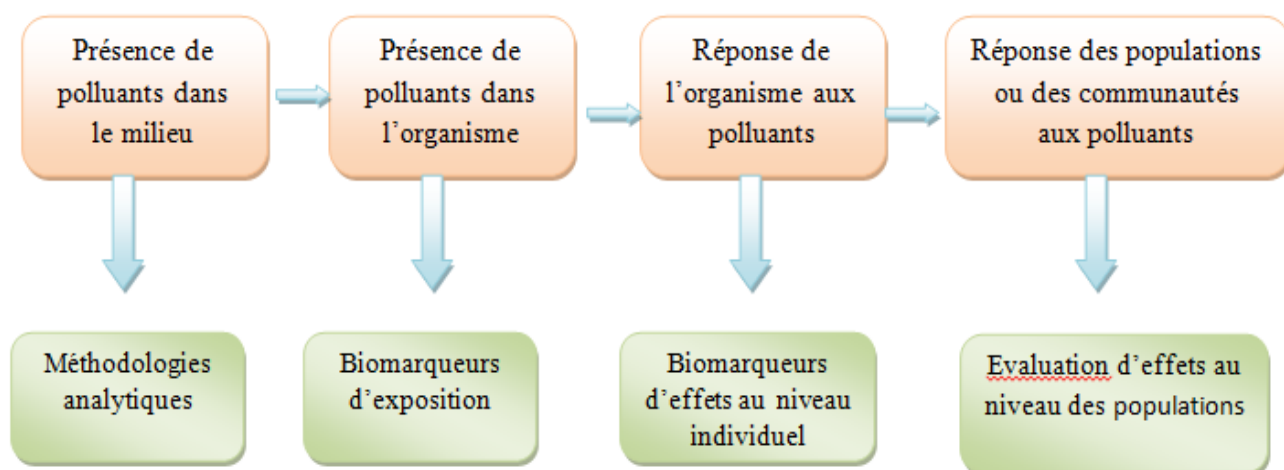


Figure 1 : Place des biomarqueurs dans l'évaluation de la contamination de l'environnement (**Lagadic *et al*, 1997**)

➤ *Intérêts des marqueurs du stress oxydant*

Au cours de la dernière décennie, l'utilisation de biomarqueurs pour étudier les effets de produits chimiques spécifiques a augmenté, ces marqueurs permettent d'évaluer les causes (production de ROS), les conséquences (dommages oxydatifs) et les réponses de l'organisme (système antioxydant) au stress oxydant. En effet, cette vision multiparamétrique permet plus facilement la relation entre les biomarqueurs et la pollution (**Ruas *et al*, 2008**).

I.3. Les pesticides

I.3.1. Définition

Un pesticide est défini comme «*toute substance ou association de substances qui est destinée à repousser, détruire ou combattre les ravageurs (y compris les vecteurs de maladies humaines ou animales) et les espèces indésirables de plantes ou d'animaux causant des dommages ou se montrant autrement nuisibles durant la production, la transformation, le stockage, le transport ou la commercialisation des denrées alimentaires, des produits agricoles,*

du bois et des produits ligneux, ou des aliments pour animaux, ou qui peut être administrée aux animaux pour combattre les insectes, les arachnides et les autres endo- ou ectoparasites...» (FAO, 2003).

I.3.2. Classification des pesticides

I.3.2.1. Classification chimique : il existe trois catégories de pesticides (Calvet *et al*, 2005)

Les pesticides inorganiques : ils sont peu nombreux mais certains sont utilisés en grande quantités comme le soufre ou le cuivre. Ce sont des pesticides très anciens dont l'emploi est apparu avant la chimie organique de synthèse. De cette époque ne subsiste qu'un seul herbicide employé en tant que désherbant total (chlorate de sodium) et quelques fongicides à base de soufre et cuivre.

Les pesticides organo-métalliques : Ce sont des fongicides dont la molécule est constituée par un complexe fait d'un métal comme le zinc ou le manganèse et d'un anion organique dithioarbamate (exemple : mancozèbe avec le zinc, manèbe avec le manganèse).

Les pesticides organiques : ils sont très nombreux et appartiennent à diverses familles chimiques (une famille chimique ou classe chimique correspond à l'ensemble des molécules dérivées d'un groupe d'atomes qui constituent une structure de base). Il existe actuellement plus de 80 familles ou classes chimiques dont les plus connues sont les Organophosphorés, Uraciles, Carbamates, Diphényl éther..., mais leurs appellations sont parfois arbitraires et peuvent donc être différentes d'un ouvrage à un autre.

I.3.2.2. Classification biologique

Selon les organismes visés, trois grandes classes se distinguent : les **insecticides**, destinés à éliminer les insectes nuisibles, les **herbicides**, destinés à éliminer les adventices des cultures, les **fongicides**, destinés à lutter contre les parasites et champignons pathogènes. D'autres classes mineures correspondent à des substances actives destinées à combattre des cibles spécifiques : **acaricides** (acariens), **nématocides** (nématodes), **corvicides** (oiseaux ravageurs), **rodenticides** (rongeurs) et **molluscicides** (limaces et escargots).

Classification selon l'usage

Les pesticides sont utilisés dans plusieurs domaines d'activités pour lutter contre des organismes vivants nuisibles. Il existe six catégories de pesticides selon leur destination de traitement, à savoir : les **cultures**, les **bâtiments d'élevage**, les **locaux de stockage des produits végétaux**, les **zones non agricoles**, les **bâtiments d'habitation**, **l'homme** et les **animaux**.

I.3.3. Voies de contamination des écosystèmes

Les sources de contamination peuvent être ponctuelles ou diffuses (Lundberg *et al*, 1955). Une contamination **ponctuelle** par des pesticides utilisés pour des besoins agricoles est due à un emploi incorrect du produit. Une élimination insuffisante des solutions non utilisés et le nettoyage du matériel de pulvérisation comporte un risque de contamination.

Il peut aussi se produire une dérive de brouillard de dispersion pendant l'application, ou encore le produit peut être pulvérisé en des lieux inappropriés, tels des fossés ouverts. La manipulation du produit inutilisés et des emballages est également importante.

Une contamination **diffuse** des eaux de surfaces peut être consécutive à une application normale des pesticides. Outre, les autres facteurs telle la nature du sol et les conditions climatiques, dans ce cas, la contamination est due aux propriétés intrinsèques du pesticide qui lui confèrent une certaine mobilité. Les propriétés les plus importantes dans ce contexte sont la dégradabilité, la volatilité et la mobilité dans le sol

Voies d'exposition aux pesticides : cutanée (et oculaire), la voie digestive (ou orale) et la voie respiratoire.

I.3.4. Contamination des eaux par les pesticides

Le milieu aquatique est le récepteur ultime de nombreux contaminants toxiques d'origine anthropique. L'agriculture est actuellement à l'origine d'une pollution de l'eau préoccupante dans beaucoup de pays dont les pays méditerranéens (**keddal, 2007**). Les pesticides et leurs résidus sont parmi les composés qui affectent le plus les écosystèmes et les organismes aquatiques (**Shahidul et Tanaka, 2004**), et qui peuvent entraîner la présence de produits de transformation dans les écosystèmes aquatiques présentant un risque potentiel ou réel similaire ou plus élevé que le pesticide d'origine.

I.3.5. Le pesticide étudié

I.3.5.1. Description

MARCANA : est un herbicide à base de l'**oxyfluorène** de contact agissant sur la plupart de dicotylédones et graminées annuelles, sélectif sur oignon.

L'**oxyfluorène** est une substance phytosanitaire de la famille des éthers de diphényle, à usage herbicide agissant sur les dicotylédones et quelques graminées annuelles au cours de leur émergence ainsi que sur les jeunes plantules déjà levées.

Il a également une action frénatrice sur certaines plantes vivaces. Cette substance est sélective par contact et est un inhibiteur de la protoporphyrinogène oxydase (ppo) menant à des dommages irréversibles des membranes cellulaires.

Il a été évalué dans le cadre de la Directive 91/414/CEE (C.E., 1991). Le rapport d'évaluation (Draft Assessment Report) proposé par l'Etat membre rapporteur (Espagne) est publiquement disponible auprès de l'EFSA (EFSA, 2007; EFSA, 2010a) et les conclusions de l'EFSA ont été diffusées (EFSA, 2010b).

L'évaluation est terminée et l'exclusion de l'oxyfluorène à l'Annexe I de la Directive 91/414/CEE a été prononcée dans la Décision de la Commission 2008/934/CE (C.E., 2008a).

Un rapport des Etats-Unis (US-EPA, 2002) est également disponible pour l'oxyfluorène.

I.3.5.2. Devenir de l'oxyfluorène dans l'environnement

a-La persistance

Hydrolyse : L'oxyfluorène est stable à l'hydrolyse aux pH 4 à 9 (demi-vie supérieure à 28 jours)(EFSA, 2010).

Photolyse : L'oxyfluorène est rapidement photolysable dans l'eau. Une demi-vie de 0,3 jour et un DT90 de 1 jour ont été observées à une latitude de 40°N et un pH de 7. Principaux produits de la photolyse : RH45469, RH-123394, RH-35451 et RH-34670. L'écotoxicité de ces produits a été testée chez les microalgues et algues d'eau douce (EFSA, 2010).

Biodégradabilité : L'oxyfluorène n'est pas facilement biodégradable, d'après l'agence de protection environnementale des Etats Unis l'oxyfluorène avait des demi-vies de 291 à 294 jours pour les sols limon argileux et 556-596 jours pour les sols sablo-limoneux, et l'Australie a

signalé une demi-vie dans le sol de 119 jours pour un sol sableux dans un climat de type méditerranéen (EFSA, 2010).

b-La distribution

Adsorption : Le Koc de l'oxyfluorène varie entre 5450 et 12233 L/kg et la valeur de $\log K_{ow} = 4,86$ suggère que l'oxyfluorène a une très faible mobilité. Il aura tendance à fortement s'adsorber sur les sédiments et matières en suspension (EFSA, 2010b; Janaki, 2013).

Volatilisation : La valeur de la constante de Henry ($2,382 \cdot 10^{-2}$ Pa m³/mol) indique que l'oxyfluorène n'est pas une substance volatile (EFSA, 2010a).

Bioaccumulation : Une étude sur 54 jours a été réalisée sur (*Lepomis macrochirus*) avec une exposition de 40 jours et une période de dépuración de 14 jours. Un BCF de 2200 (corps entier) a été déterminé. La vitesse de dépuración des organismes est lente, elle est de 82% après 14 jours. (EFSA, 2010a E.C., 2011)

I.3.5.3. L'éco toxicologie et la toxicité de l'oxyfluorène

L'oxyfluorène est un composé toxique, qui contamine l'environnement et affecte les organismes non ciblés. Il est très toxique pour les plantes aquatiques et les poissons, il contamine l'eau de surface par ruissellement, il provoque une toxicité chez les plantes par l'inhibition de la photosynthèse.

Parmi les effets toxicologiques de l'oxyfluorène, plusieurs études montrent que cette substance est nocive pour la faune et la flore aquatique.

- Les effets d'une exposition à l'oxyfluorène chez les algues d'eau douce (*Navicula pelliculosa*), la concentration produisant 50% d'effets (EC50) dans exposition de 120h statique est : 0,24 µg/L (Giddings JM 1990, cité par EFSA, 2007; EFSA, 2010a).
- Chez la plante Lemnagibba EC50 dans (14 jours) d'exposition est de 1,4 µg/L.
- Chez les invertébrés d'eau douce (*Daphnia magna*) la concentration produisant 50% d'effets EC50 = 72 µg/L dans 48h d'exposition (Bell G 1996, cité par EFSA, 2007; EFSA, 2010a).
- Concernant les poissons Les CL 50 pour trois espèces de poissons d'eau douce varient de 200 µg / L à 410 µg / L, en classifiant oxyfluorène comme «hautement toxique» sur une base aiguë.

- Par exemple la concentration létale qui cause la mort de 50% de la population chez (*Oncorhynchus mykiss*) dans des expositions de 96 h (statique) est de 250 µg/L et chez (*Lepomis macrochirus*) La CL50 est de 210 µg/L (**Graves WC, 1991**)
- Selon (**Goldenthal et Wazeter, 1977**), la NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) chez la souris est de 0,3 mg/kg corporel/j chez les mâles et 0,4 mg/kg corporel/j chez les femelles.
- D'après **Frey (2003)**, la CL50 de Canard colvert (*Anas platyrhynchos*) est ≥ 5000 mg/kg/jour.

I.3.5.4. Les effets de l'oxyfluorène sur la santé humaine

- **Cancérogène** : La substance n'est pas inscrite à l'Annexe VI du règlement (CE) No 1272/2008. Par conséquent, elle ne fait pas l'objet d'un classement pour la cancérogénèse.
- Lors de l'étude expérimentale de (**Goldenthal et Wazeter, 1977**), sur la souris, il a été constaté une augmentation de l'incidence globale d'apparition d'adénomes et de carcinomes hépatiques.
- L'US EPA classe l'oxyfluorène comme une substance possiblement carcinogène pour l'homme.
- **Effets endocriniens** : L'oxyfluorène n'est pas cité dans la stratégie communautaire concernant les perturbateurs endocriniens (**E.C., 2004 ; E.C., 2007**) et dans le rapport d'étude de la DG ENV sur la mise à jour de la liste prioritaire des perturbateurs endocriniens à faible tonnage (**Petersen et al., 2007**).
- **Mutagenèse** : La substance n'est pas inscrite à l'Annexe VI du règlement (CE) No 1272/2008. Par conséquent, elle ne fait pas l'objet d'un classement pour la mutagenèse.
- **Toxicité pour la reproduction** : La substance n'est pas inscrite à l'Annexe VI du règlement (CE) No 1272/2008. Par conséquent, elle ne fait pas l'objet d'un classement pour la reproduction.

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.1. Période et lieu de stage

Notre étude a été réalisée au Centre National de Recherche et de Développement de la Pêche et de l'Aquaculture (CNRDPA) de Bou Ismail – Tipaza durant une période de 4 mois, au sein de la division écosystèmes aquatiques.

Le CNRDPA est, depuis 2008, un établissement public à caractère scientifique et technologique (EPST) à vocation sectorielle dont l'activité est centrée sur l'analyse des écosystèmes aquatiques – marins et continentaux – exploités placé sous la tutelle du Ministère de l'Agriculture, du Développement Rural et de la Pêche – MADRP.

Le CNRDPA est organisé en quatre divisions de recherche :

1-Division aquaculture : chargée de la mise en œuvre et l'exploitation des projets de recherche/développement relatifs à la valorisation des ressources hydriques et maîtrise des techniques d'élevage en pisciculture continentale et marine.

2-Division pêche : a pour mission l'évaluation des ressources halieutiques à travers les campagnes en mer, et elle œuvre aussi dans le développement des techniques des pêches.

3-Division industrie et transformation des produits de la pêche et de l'aquaculture : a pour objectif principal la valorisation et transformation des ressources aquatiques issues des activités de la pêche et de l'aquaculture

4-Division écosystème aquatique où on a effectué note étude expérimentale, et qui a pour mission le suivi et la surveillance des écosystèmes, ainsi elle étudie l'impact de la pollution sur la ressource aquatique.

II.2. Matériels utilisés

II.2.1. Matériel biologique

- Poisson Tilapia (*Oreochromis*) : Hybride rouge résultant de croisement entre l'*Oreochromis niloticus* et l'*Oreochromis mossambicus*.

Chapitre II : Matériels et méthodes

Acquisition et maintenance du poisson :

Trois cent individus du tilapia hybride rouge (*Oreochromis* sp.) ont été obtenus de la pépinière Garden de Chéraga.

Les individus sont transportés vivants par la route, en utilisant un réservoir spécialisé (vivier). Le transport provoque normalement du stress chez les animaux, qui peut durer plusieurs jours (Davis et Parker, 1986 ; Chandroo et al., 2005 ; Jonsson et al., 1999), pour cela les individus ont été élevés durant 15 jours pour une période d'adaptation dans des aquariums (60 cm x 40 cm x 40 cm), contenant un volume d'eau de 70 litres (25 individus par aquarium).

L'eau des aquariums est renouvelée quotidiennement, la température a été maintenue entre 24 et 26 ° C. La nourriture était offerte trois fois par jour et consistait en une ration de granulés flottants correspondant à 4 % du poids corporel.



Photo2 : unité d'élevage expérimentale

1 : diffuseur d'oxygène 2 : thermorégulateur

II.2.2. Matériel non biologique

La liste du matériel non biologique utilisé pour la réalisation de notre étude est présentée en annexe-2.

II.3. Méthodes

II.3. 1. Test de toxicité de longue durée

Après l'étape d'acclimatation dans des conditions expérimentales semblables, les individus sont exposés à l'oxyfluorène à des concentrations de 0,1 ,0,3 et 0,5 mg/l pendant 21 jours et comparés aux témoins (0 mg/l d'oxyfluorène).chaque concentration est faite en triplicat(photo3.).



photo3 :opération de contamination

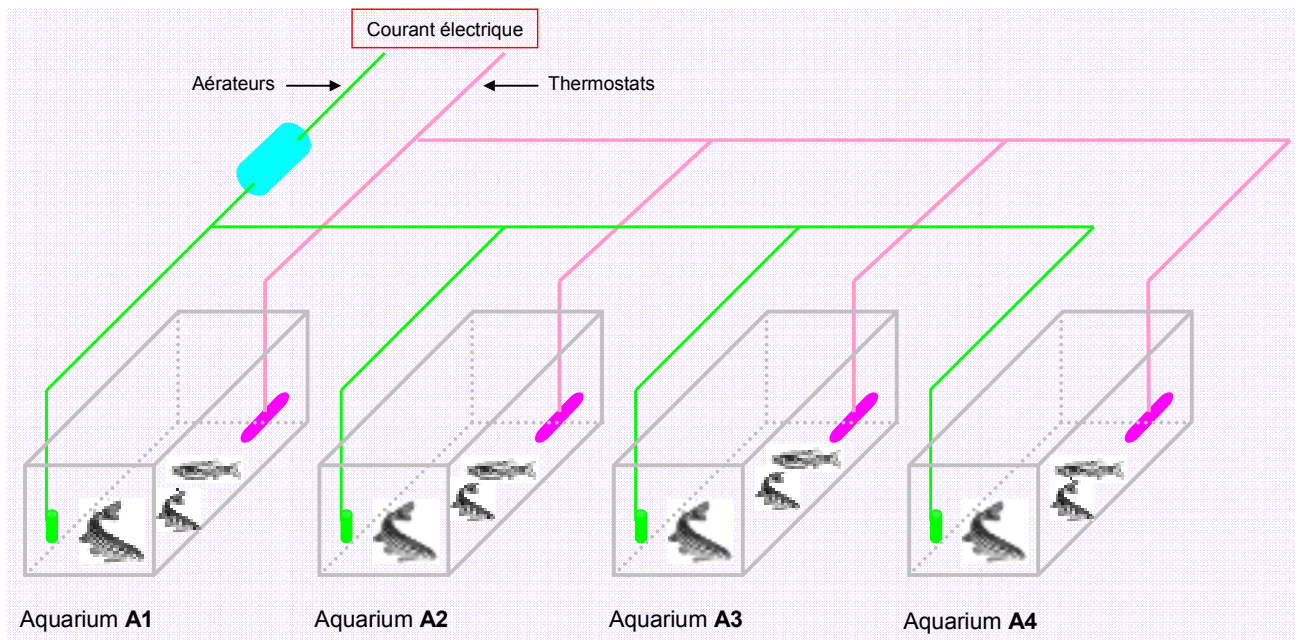


Figure2 : dispositif expérimental

Chapitre II : Matériels et méthodes

II-3-2 Suivi et mesure des paramètres au cours des cycles expérimentaux

Notre étude a porté sur deux matrices :

- L'eau d'élevage pour l'étude physico-chimique (La température, la salinité, l'oxygène dissout et le pH sont mesurés au moyen d'un Multiparametre) , et Suivi de l'excrétion azotée et phosphorée .
- Les poissons pour la mesure biochimique (catalase, protéase,) : à t=0 ,7,14,21 jours, trois individus de chaque aquarium ont été prélevés , anesthésiés, et ont été utilisés pour récupérer les différents organes :gonades,intestin et foie sont conservés dans des tubes secs a une température de – 80 °C .

II-3-2-1- Paramètres physicochimiques (Eau d'élevage)

Le suivi des paramètres physiques d'eau d'élevage a été réalisé quotidiennement. Dans le but de s'assurer sa qualité convenable à la survie des poissons d'une part et d'autre part pour minimiser au maximum toute sorte de stress. Nous avons utilisés le pHmètre pour mesure le pH et un thermomètre pour la température.

Les analyses chimiques de l'eau (concernant les nitrites, l'azote ammoniacal et le phosphore) sont réalisées au laboratoire de recherches au CNRDPA chaque jour.

II-3-2-1-1 Suivi de l'excrétion azotée et phosphorée

Chaque jours environ 500 ml sont prélevées de chaque aquarium pour être par la suite filtrées à l'aide des papiers filters et des entonnoirs. Le filtrat récupéré est destiné au dosage du phosphore et des différentes formes d'azote dissous.

II-3-2-1-1-1 Dosage du phosphore

Selon la méthode adoptée ou(CNRDPA)

❖ Principe

Les ions phosphates réagissent avec le molybdate d'ammonium, en présence d'antimoine(III), pour former un complexe que l'on réduit par l'acide ascorbique ; cette

Chapitre II : Matériels et méthodes

forme réduite, de coloration bleue, a un maximum d'absorption à 885 nm. Ce composé bleu contient le phosphore. Les poly phosphates et le phosphore organique ne sont pas dosés par cette méthode.

❖ Mode opératoire

10ml du mélange-réactif phosphore (**voir annexe 2**), préparé à chaque série d'analyses, sont ajoutés à 100ml de filtrat et on homogénéise aussitôt. Après 05minutes de repos la lecture de l'absorbance des échantillons est faite à 885nm.

Dans le blanc l'eau distillée remplace les 100ml du filtrat.

II-3-2-1-1-2 Dosage de l'azote ammoniacal par la méthode au bleu d'indophénole

❖ Principe

La méthode décrite mesure la totalité de l'azote ammoniacal, soit $N-NH_3 + N-NH_4^+$, symbolisé par $N-NH_{3,4}$. Il s'agit de la méthode de Koroleff (1969) qui est simple et qui offre une bonne précision ainsi qu'une bonne sensibilité.



Dans un premier temps, l'ammoniac forme une monochloramine avec l'hypochlorite en milieu légèrement basique. Cette dernière réagit avec le phénol en présence d'un excès d'hypochlorite pour former le bleu d'indophénolabsorbant à 630 nm.

❖ Mode opératoire

Trois ml du réactif (1), solution de phénol-nitroprussiate(**voir annexe (2)**), sont additionnés à 100ml du filtrat récupéré. Directement après homogénéisation, 03ml du réactif (2) solution alcaline d'hypochlorite (**voir annexe 2**)sont ajoutés au mélange.

L'échantillon final homogénéisé est placé à l'obscurité pendant une nuit à température ambiante. Ainsi l'absorbance est mesuré à 630nm.

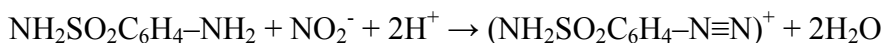
Dans le blanc l'eau distillée remplace les 100ml du filtrat.

II-3-2-1-1-3 Dosage de l'azote nitreux

Chapitre II : Matériels et méthodes

❖ Principe

Les ions nitrites forment un diazoïque avec la sulfanilamide en milieu acide ($\text{pH} < 2$) selon la réaction :



Puis le diazoïque réagit avec le N-naphtyl-éthylènediamine pour former le colorant :



Le colorant rose absorbe à la longueur d'onde de 543 nm.

❖ Mode opératoire

01ml de réactif (3), solution de sulfanilamide (**voir annexe 2**), est ajouté à 50ml de filtrat. Après homogénéisation, on laisse reposer 02 à 08 minutes et on ajoute 01ml de réactif (4) solution de n-naphtyl-éthylènediamine(**voir annexe 2**) au mélange. Après au moins 10 minutes (sans dépasser les 02h) de repos la lecture de l'absorbance des échantillons est faite à 543nm.

Dans le blanc l'eau distillée remplace les 50ml du filtrat.

La préparation des réactifs illustrée dans (**l'annexe2**).

II-3-2-2 Paramètres biométriques :

Chaque 7 jours pendant 42 jours, trois (03) individus de chaque aquarium sont prélevés et anesthésiés par le Phénoxy-ethanol. Par la suite la taille et le poids sont mesurés avant de procéder à la dissection et la séparation des différents organes, à savoir le foie et les gonades, dans le but de calculer les rapports somatiques. Puis l'ensemble des individus de chaque aquarium est pesé et mesuré.

Chapitre II : Matériels et méthodes



Photo 4 : mensuration et pesée des individus

On choisit ces deux rapports car :

La récupération des organes est facile.

Ils sont des perturbateurs endocrinien car le factures la plus touché c'est la reproduction.

❖ Rapport hépato somatique RHS :

Le RHS est le rapport entre le poids du foie et le poids du poisson éviscéré, en pourcentage.

Il est donné par l'expression suivante (**Lagadicet al, 1997 ; Lagadicet al, 1998 ; Dongmezaet al, 2006; Kojadinovic et al, 2006; Shaw et handy, 2006**)

$$\%RHS = \left(\frac{\text{Poids du foie}}{\text{Poids du poisson}} \right) \times 100$$

❖ Rapport gonado somatique RGS :

C'est le rapport entre le poids des testicules et le poids du poisson éviscéré, exprimé en pourcentage. Il est considéré comme étant un bon coefficient de maturité des poissons (**Lahaye, 1980**).

Il est exprimé comme suit (**Pieters, 2004; Kojadinovic et al, 2006; Rad et al, 2006**)

$$\%RGS = \left(\frac{\text{Poids des gonades}}{\text{Poids du poisson}} \right) \times 100$$

II-3-2-3 Paramètres bioénergétiques :

Chapitre II : Matériels et méthodes

❖ Gain en poids journalier GPJ

Le gain en poids journalier (gramme poisson/jours), peut être calculé par la relation suivante (**Glasser et Oswald, 2001**) :

$$GPJ_{\max} = 17.10^{-9} \times T^{4,785} \times P^{3,397 \times T^{-0,579}}$$

Dans cette expression, la température (T) est exprimée en degré Celsius et le poids (P) en gramme.

❖ Ration maximale R_{mx}

La ration maximale (gramme d'aliment/jours) qui peut être absorbée par le poisson tilapia est donnée par la relation énergétique suivante (**Glasser et Oswald, 2001**) :

$$R_{mx} = 0,192 \times P^{0,685}$$

❖ Ration quotidienne de maintenance R_{mt}

Elle est donnée par la relation suivante (**Glasser et Oswald, 2001**) :

$$R_{mt} = 0,035 \times P^{0,564}$$

❖ Contenu calorique C

Il est donné par l'expression suivante (**Xieet al, 1997**):

$$\ln C_{\max} = 1,45 + 0,42 \ln P$$

Le C_{\max} est exprimé en (KJ/J) et le poids P en (g).

❖ Énergie liée à la respiration R

Chez le tilapia *Oreochromis*, le métabolisme de l'oxygène peut être estimé par la relation suivante :

Chapitre II : Matériels et méthodes

$$M(O_2) = 0,48 \times P^{0,7502}$$

D'après Lemoset *al*(Lemoset *al*, 2006), 1mg (O₂) correspond à une valeur énergétique de 14,06 J.

❖ Énergie liée à l'excrétion U

Les valeurs mesurées en mg/l de l'excrétion azotée sont converties en valeurs énergétiques en Joule. Selon Lemoset *al*(Lemoset *al*, 2006), 1mg/l N-NH₃ correspond à une valeur énergétique de 24,87J.

II-3-2-4 Les mesures biochimiques :

II-3-2-4-1 Préparation des échantillons tissulaires en vue des analyses des biomarqueurs :

Les dosages biochimiques relatifs aux suivis de biomarqueurs nécessitent que les tissus biologiques (foie et intestin) fassent l'objet préalable d'une homogénéisation et d'un fractionnement subcellulaire (figure3) dans un tampon adapté, qui devra avoir les propriétés physicochimiques permettant de maintenir la stabilité des molécules ou organites qu'on désire étudier.

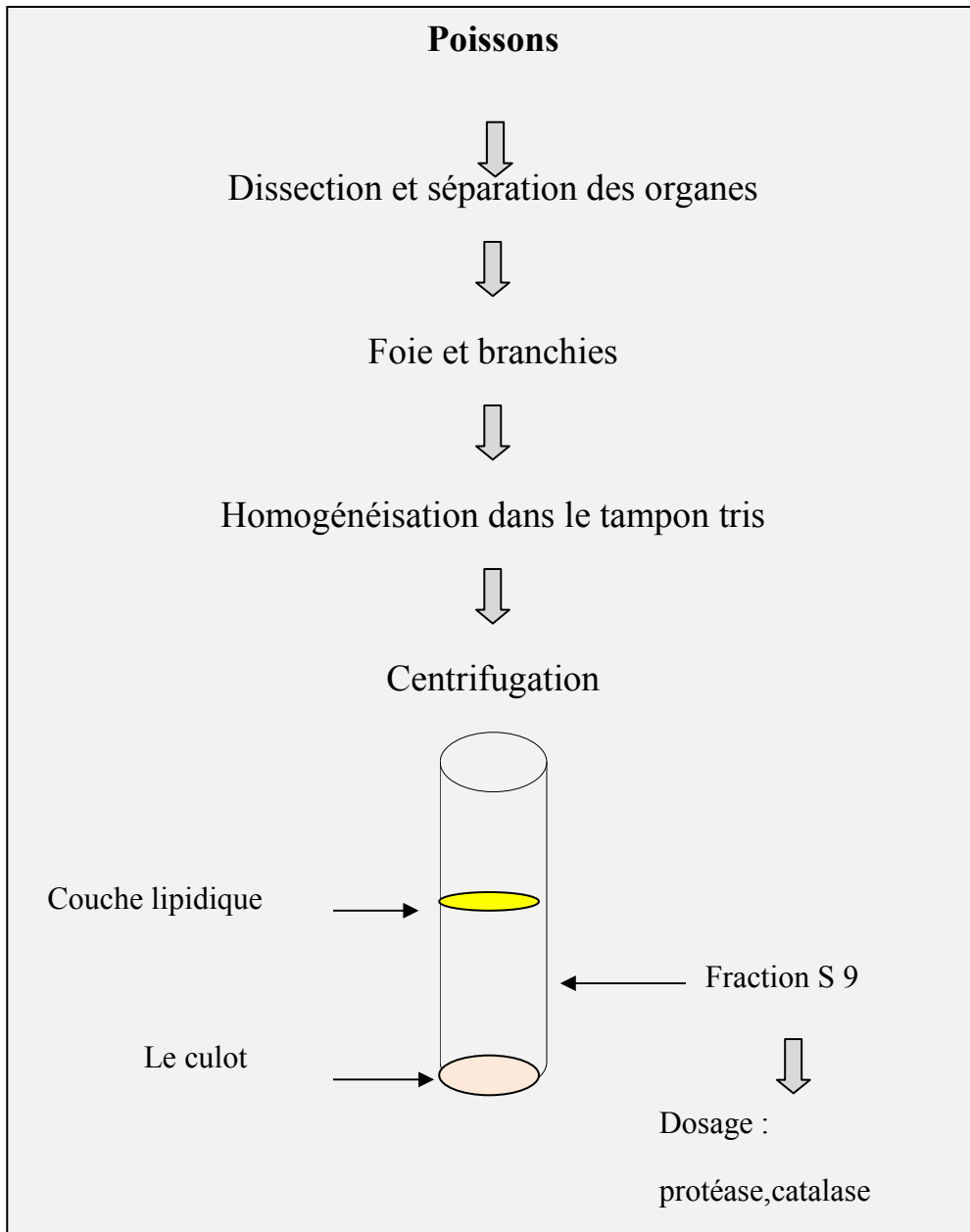


Figure 3: Procédures expérimentales (dosages biochimiques).

II-3-2-4-2 Homogénéisation des tissus Foie et intestin :

Chapitre II : Matériels et méthodes

Les branchies et le foie sont homogénéisés à raison de (1/10 P/V) dans le tampon tris (tris(hydroxyméthyl)aminométhane) (20mM ; pH7,2) en utilisant un mixeur déchiqueteur.

La centrifugation de l'homogénat est faite à 6 000g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant ainsi obtenu (Fraction S9) est utilisé pour doser la catalase, protéase.

II-3-2-4-3 Dosage de la protéase dans l'intestin :

❖ Principe

L'approche du dosage de la protéase souvent utilisée est celle à temps fixe. Elle consiste essentiellement à mélanger les composants de la réaction et à incuber durant un certain temps. A la fin de l'incubation (généralement de 30min à 02h), on prélève des échantillons. On y mesurera alors la quantité des sous-produits issus de la dégradation du substrat (dans le cas de protéases la tyrosine est le sous-produit issus de la dégradation de la caséine).

❖ Mode opératoire

Le dosage de l'activité protéase est déterminé selon la méthode décrite par **(Ranilson et al, 2005)**.

01 ml de la solution de caséine (01% P/V dans le Tris-HCl pH7.2) utilisée comme substrat est incubée avec 01 ml de surnageant (source d'enzyme **S9**), préalablement dilué à différentes rations(1/10 et 1/15), mixer et incuber dans un bain marie à une température de 40°C pendant 10 minutes.

La réaction est stoppée en ajoutant 04 ml du TCA à 5% (Acide trichloroacétique). On laisse reposer pendant 15 min et on effectuera une centrifugation à 6000g pendant 15min.

La coloration :

Prendre 1 ml de surnagent centrifugé, ajouter 2,5 ml de NaCO₃ et 0,5 folin (1/4), mixer et incuber à 40 °C pendant 15 minutes, et on fait une deuxième centrifugation à 6000 g pendant 5 minutes. Ainsi la lecture de l'absorbance est faite à 660nm.

Chapitre II : Matériels et méthodes

Le blanc contient 1 ml de l'eau distillée remplace le surnageant (la fraction S9).

II-3-2-4-4 Dosages de la Catalase dans le foie :

❖ *Principe :*

L'acide acétique en présence de peroxyde d'hydrogène entraîne la réduction du dichromate en acétate chromique et la formation d'acide perchromique.

H₂O₂ se sépare lors de la préparation de la catalase et la réaction est arrêtée avec l'addition d'un mélange d'acide bichromate acétique.

Le peroxyde d'hydrogène restant est évalué en mesurant l'acétate chromique par colorimétrie après avoir chauffé le mélange réactionnel.

❖ **Mode opératoire :**

Dans des tubes à essais ,100µl de surnageant (source d'enzyme S9) ont été prélevés en triple, ajouter 1 ml de tampon phosphate.

500 µl d'H₂O₂ ont été ajoutés aux tubes ci-dessus pour démarrer la réaction.

La réaction a été arrêtée immédiatement par addition de réactif dichromate acide acétique (2 ml) à 0,30 et à 60 secondes d'intervalle dans chacun des 3 tubes.

Le blanc contient 1,6 ml de tampon phosphate et 2 ml de dichromate acide acétique.

Les tubes et le blanc ont été chauffés pendant 10 minutes dans un bain marie à 100 °C pour développer une couleur verte, puis refroidis à température ambiante.

La lecture de l'absorbance a été faite à 570 nm.

Chapitre III : Résultats et Discussion

Cette étude avait pour objectif d'examiner l'effet de l'herbicide oxyfluorène sur la croissance et les activités métaboliques traduisant l'état de santé du poisson « Tilapia rouge » démontrés par les résultats expérimentaux.

III. 1- Résultats des analyses physico-chimiques et bactériologiques de l'aliment et de l'eau d'élevage

Dans le but de minimiser au maximum les facteurs stressants tels que le pH, la température..., l'assurance des conditions environnementales optimales pour l'élevage des poissons tests était l'étape primaire avant de commencer les tests d'écotoxicité. En effet, et dans le même contexte un contrôle de qualité physico-chimique et bactériologique de l'aliment et de l'eau d'élevage était une étape cruciale.

III. 1.1. L'aliment

Les valeurs moyennes de %H, %MM, %MO et pH de l'aliment sont respectivement : 9,33 ; 24 ; 66,67 et 6,61 (**voir annexe 3**). Ces dernières valeurs montrent un taux moyen des matières organiques assez suffisantes pour assurer les besoins énergétiques des poissons. La matière organique étant la somme des matières grasses, des protéines et des glucides principalement.

Le tilapia est un poisson sauvage reconnu par sa résistance aux pathogènes (**Zakaria et Hussein, 2006; Joyce et al, 2000; Saber et al, 2004**) Mais cela ne traduit pas l'absence de stress dont la résistance est le résultat direct de l'effet opposé à un effet gênant. Se défendre contre un pathogène pourra probablement conduire à un changement des habitudes de s'alimenter de respirer ou de nager, l'environnement devient stressant.

Le contrôle bactériologique (**voir annexe 3**), effectué sur l'aliment (Absence de : Coliformes totaux et fécaux, Streptocoques et Salmonelles), nous a permis de confirmer la bonne qualité hygiénique de ce dernier. L'absence de la flore fécale est un très bon indice de la qualité microbiologique d'un produit donné.

Vu la qualité physico-chimique et bactériologique de l'aliment, on en conclut que ce dernier ne présente pas un risque pour l'état de santé des individus.

Chapitre III : Résultats et Discussion

Par ailleurs, les aquariums employés, sont à surfaces libres en contact direct avec l'air ambiant, ce qui peut conduire à une contamination de l'eau des aquariums, par sédimentation des fines particules de poussière en suspension dans l'atmosphère environnante (Les microorganismes peuvent s'adsorber facilement à la surface des particules solides. Les conditions dynamiques de l'air étant l'agent vecteur ou transporteur).

De plus le milieu aquarium évolue rapidement, et les débris d'aliment non consommés ou rejetés s'accumulent sur le fond et forment un tapis en décomposition très propice au développement des bactéries. De fait, le renouvellement journalier de l'eau des aquariums avait pour objectif, non seulement de minimiser les pertes en polluant et l'effet toxique des composés azotés, mais également de régénérer la bonne qualité microbiologique du milieu environnant les Tilapia.

III. 1.2. Paramètres physicochimiques de l'eau d'élevage

L'eau destinée à l'élevage des poissons au CNRDPA (Division Aquaculture), est contrôlée systématiquement. Subséquemment, elle présente une bonne qualité bactériologique dont les résultats révèlent l'absence totale d'une contamination fécale pouvant infecter les poissons en élevage et/ou induire un stress pathogénique. Les résultats expérimentaux relevés quotidiennement sont illustrés par les figures (fig4 et 5) ci-dessous.

III. 1.2.1. Température

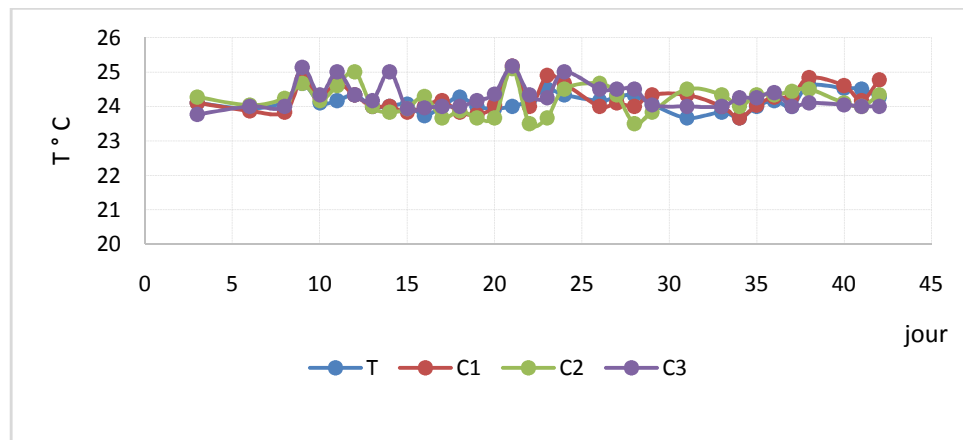


Figure 4 : Evolution de la température durant tout le cycle expérimental.

Chapitre III : Résultats et Discussion

D'après la figure(4), on constate que la variation des températures est presque identique pour tous les groupes de test et durant tout le cycle expérimental.Elle oscille sur une plage de 23,5°C minimum à 25,16°C maximum.

D'après le modèle de Martina Bocci(**Martina Bocci., 1999**), la croissance des tilapias entre 20 et 25°C est une fonction exponentielle. En dehors de ce gradient préférentiel la croissance est ralentie. A une température de 25°C l'ingestion d'aliment est meilleure.

Les mécanismes de la bioaccumulation et de détoxification des polluants chez le tilapia sont directement influencés par la température et le pH (**Umut et al,2007; Gülüzar et al,2006; Gülüzar et al,2007; Ranilson et al,2005; Sarah et al,2006**)

Pour ces raisons, la température de 25 °C est choisie pour optimiser la croissance du poisson en créant un environnement adéquat afin que ce dernier puisse exercer ces activités métaboliques d'une façon optimale.

A telle température les mécanismes de défense cellulaire sont à l'état extrême et l'agressivité des individus entre eux est minime. Donc, dans notre étude la température n'est pas un facteur stressant.

III. 1.2.2. pH

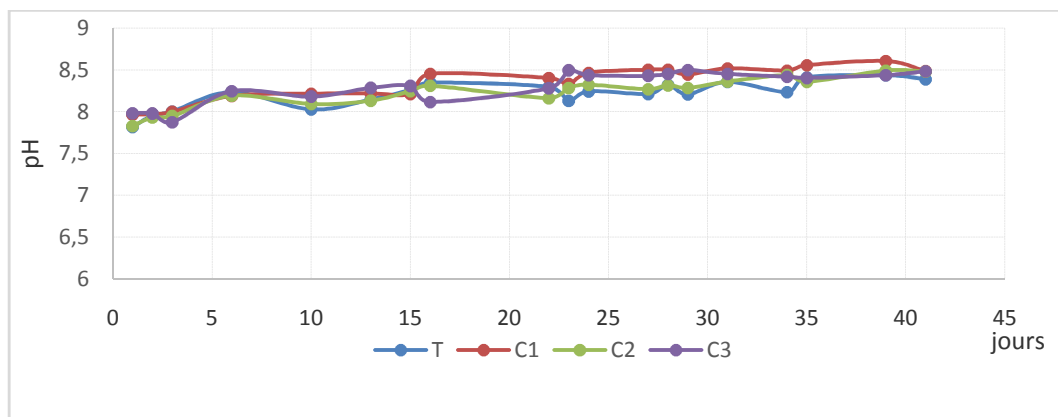


Figure 5 :Évolution du pH durant le cycle expérimental.

Chapitre III : Résultats et Discussion

L'évolution journalière des valeurs du pH mesurés (figure 5) reste toujours dans l'intervalle de tolérance des spécimens entre 7,83 et 8,6 durant tout le cycle expérimental. D'après Billard et Marcel, 1980, l'optimum de pH se situe entre 6 et 9. Ainsi le pH de l'eau d'élevage ne présentant aucun effet stressant pouvant perturber l'état de santé des individus.

III. 1.2.3. Étude de l'effet de l'oxyfluorène sur l'excrétion azotée et phosphorée

Les variations des teneurs en nitrites, azote ammoniacal et phosphore en fonction des concentrations testées de l'oxyfluorène sont graphiquement indiquées dans les figures 6A, 6B et 6C ci-dessous.

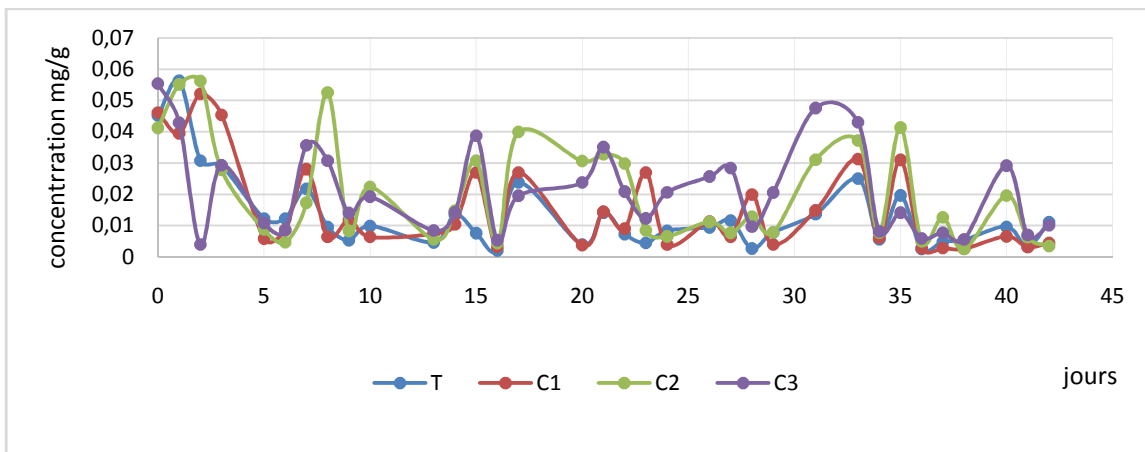


Figure 6A : Variation des taux des nitrites durant le cycle expérimental.

Les effets de l'exposition à l'Oxyfluorène sur l'excrétion azotée des tilapias sont variables selon les concentrations testées et varient entre déplétion, augmentation ou sans effets remarquables. Ainsi, les faibles teneurs relevées (0,0043 mg/g_{de poisson} minimum à 0,0561 mg/g_{de poisson} maximum) en fonction de la charge rendent la discussion du résultat très difficile.

Chapitre III : Résultats et Discussion

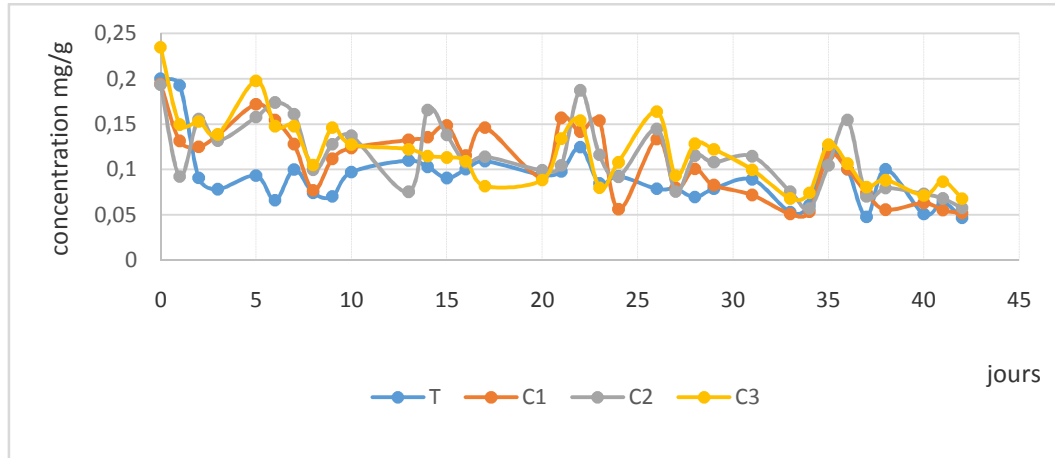


Figure 6B :Évolution des taux de l'azote ammoniacale durant le cycle expérimental.

L'excrétion ammoniacale varie en fonction de la quantité et de la qualité des protéines ingérées, du nombre de repas, de la taille de l'individu, de la température et de la concentration ammoniacale ambiante. D'autres paramètres comme l'état physiologique, le stress etc. entrent en ligne de compte mais aucune donnée bibliographique n'y a trait (**Meknachi, 2009; Garidou, 1994; Pagand, 1999**).

Dans le cas des individus témoins l'ingestion d'aliment est souvent intégrale contrairement aux individus contaminés où l'aliment restant flotte en surface puis se sédimente au fond des aquariums sous forme de fines particules.

Après chaque renouvellement de l'eau des aquariums on constate une très forte excrétion des composés azotés dans le groupe des témoins, par la suite une diminution d'excrétion est observée. Entre 0,6 et 0,2 mg/l les composés azotés deviennent toxiques au tilapia pour des courtes durées d'exposition (**Saber, 2004**) ce qui probablement traduit le ralentissement d'excrétion. La concentration ammoniacale ambiante devient un facteur gênant.

Dans le cas des individus soumis à la contamination l'excrétion est faible mais permanente ce qui permet d'atteindre des valeurs proches de celles enregistrées chez les spécimens témoins. Aussi, il est à noter que l'aliment en décomposition (libérations des bases aminées) au fond des aquariums contribuera certainement à une augmentation des teneurs ammoniacales dans le milieu d'élevage.

Chapitre III : Résultats et Discussion

Lecycle de décontamination avait un effet curatif sur les poissons antérieurement contaminés. Les teneurs ammoniacales relevées aux derniers jours étaient presque identiques pour l'ensemble des groupes de tests. Du point de vue réversibilité des effets, il est probable que les spécimens décontaminés ont repris progressivement leur état de santé.

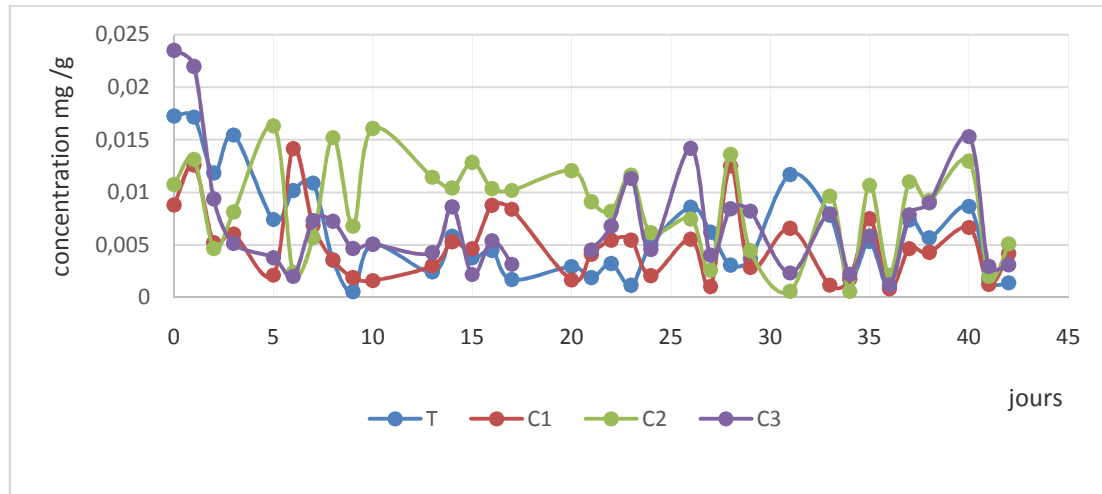


Figure 6C :Variation de l'excrétion phosphorée durant le cycle expérimental.

La contamination du poisson tilapia par l'oxyfluorène ne semble pas avoir un effet clair sur l'excrétion phosphorée des individus contaminés.

L'excrétion du phosphore dissous s'effectue sous forme d'orthophosphates par des processus actifs liés essentiellement à l'activité rénale (**Pagand,1999**), le phosphore étant indispensable aux réactions énergétiques, l'organisme économise cet élément et peut même le stocker dans les tissus osseux.

Malgré un manque de recherche et de connaissance sur l'excrétion phosphorée des poissons, il est fort probable que les facteurs stimulants cette excrétion soient les même que ceux influençant l'excrétion azotée (**Meknachi, 2009;Pagand, 1999**).

III.2. Étude de l'effet de l'oxyfluorène sur les paramètres bioénergétiques

Les différents résultats sont regroupés dans la (figure 7) et les tableaux (2,3 ,4 et 5)

Chapitre III : Résultats et Discussion

III.2.1. Gain en poids journalier GPJ

Les valeurs obtenues sont graphiquement indiquées dans la figure 7.

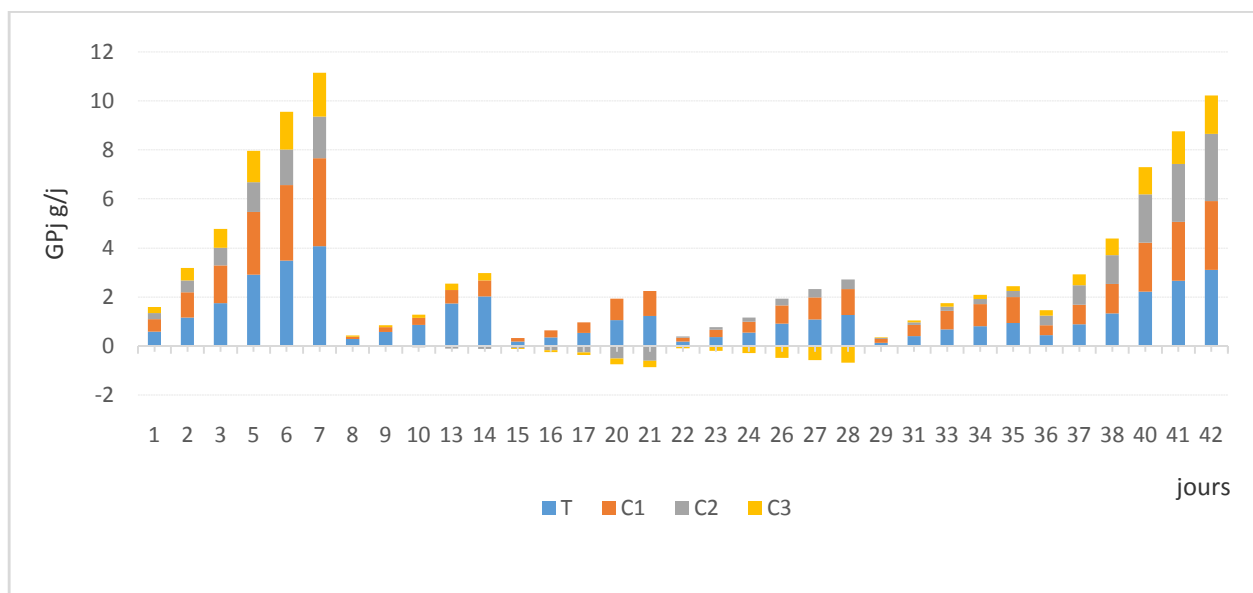


Figure 7 : Valeurs moyennes du gain en poids journalier GPJ.

Parmi les outils de diagnostic, à la fois sensibles et précoces, ayant une pertinence écologique pour estimer l'ampleur des altérations des écosystèmes aquatiques en lien avec la présence de contaminants, apparaissent les réponses suborganismales révélatrices de l'état de santé des organismes, en particulier celles liées aux métabolismes énergétiques et à la bioénergétique (Lagadic *et al.*, 1997; Amiard *et al.*, 2008; Roche *et al.*, 2003). De fait, plusieurs paramètres en lien avec le métabolisme énergétique sont recherchés.

Ainsi, dans notre étude le calcul des gains en poids journaliers (GPJ) chez les différents groupes de tests, montre une tendance identique pendant le cycle d'adaptation. Cependant et durant le cycle de contamination une nette différence est observée entre les spécimens témoins et ceux exposés au polluant à différentes concentrations. Ces derniers ont montré de faibles gains en poids et cela jusqu'à la fin du cycle de contamination.

III.2.2. Ration maximale R_{mx}

Les faibles gains en poids mesurés chez les poissons contaminés semblent être le résultat de l'efficacité de l'ingestion traduite par le R_{mx} (Tab 02) dont les valeurs mesurées pendant le

Chapitre III : Résultats et Discussion

cycle de contamination sont nettement inférieures à celles mesurées chez le groupe témoin. Sachant que dans les milieux contaminés la diminution de l'ingestion limite la capacité d'une espèce à maximiser sa prise énergétique, la conduisant à une conversion réduite de l'énergie (Amiard *et al.*, 2008). Selon (Hansen *et al.*, 2004) l'inhibition de la croissance est principalement due à la réduction de la conversion de l'énergie alimentaire en biomasse.

Tableau 02 : Valeurs moyennes de R_{mx}

Temps (j)	0	7	14	21	28	35	42
T	1,3311	1,5433	1,6437	1,7034	1,7642	1,8085	1,9517
C1	1,3430	1,5301	1,562	1,6136	1,6652	1,7164	1,8486
C2	1,2848	1,3766	1,3702	1,3381	1,3590	1,3718	1,5149
C3	1,3138	1,3989	1,4147	1,4005	1,3644	1,3750	1,4569

III.2.3. Ration quotidienne de maintenance R_{mt}

Tableau 03 : Valeurs moyennes de la Ration quotidienne de maintenance R_{mt}

Temps (j)	0	7	14	21	28	35	42
T	0,1723	0,1946	0,2050	0,2111	0,2173	0,2218	0,2362
C1	0,1736	0,1933	0,1967	0,2019	0,2072	0,2124	0,2258
C2	0,1674	0,1772	0,1765	0,1731	0,1753	0,1766	0,1917
C3	0,1705	0,1795	0,1812	0,1797	0,1759	0,1770	0,1856

Idéalement le métabolisme énergétique est lié à l'énergie allouée aux fonctions de défense de l'organisme et à celles allouées à la maintenance du métabolisme de base, de la croissance et de

Chapitre III : Résultats et Discussion

la reproduction(Lagadic *et al*, 1997;Lagadic et al, 1998; Stello, 2005; Amiard et l, 2008; Virginie, 2005).

L'analyse énergétique peut révéler un déséquilibre de cette balance associée à l'exposition à des toxiques (Amiard *et al*, 2008). En effet et, dans notre étude on a constaté par exemple une diminution de l'énergie allouée à la maintenance du métabolisme de base, traduite par le R_{mt} (Tab 03) chez les spécimens contaminés comparativement aux individus témoins. Cette diminution de la maintenance peut être expliquée par le fait que la tolérance et la capacité des organismes à faire face aux stress auxquels ils sont exposés dans leur environnement nécessite une dépense supplémentaire de l'énergie allouée à la défense et cela par un système de compensation vis-à-vis des autres besoins énergétiques le plus souvent ceux alloués à la croissance puis ceux alloués à la reproduction(Lagadic *et al*, 1997; Amiard *et al*, 2008). Dans notre expérience l'augmentation de la défense est confirmée par l'induction de l'enzyme de défense antioxydante la Catalase (voir ci-après). Selon Amiard *et al* [08], les biomarqueurs de défense permettent aux organismes de lutter et de survivre à la présence de polluants à des niveaux raisonnables mais ceci a un coût énergétique pour l'individu. Ainsi, de nombreuses études (Almeida *et al*, 2002; Ana Rosa *et al.*, 2008; Gülüzar et Mustafa, 2007;Roche *et al.* 2003; Almeida *et al*, 2001) confirment encore l'augmentation des taux métaboliques dans des organismes exposés à des stress chimiques variés générant les différents biomarqueurs de défenses.

Tableau 04 : Les valeurs de l'Énergie liée à la respiration R

Temps (j)	0	7	14	21	28	35	42
C1/T	1,0097	0,9906	0,9463	0,9424	0,9387	0,9443	0,9422
C2/T	0,9620	0,8823	0,8193	0,7677	0,7514	0,7388	0,7576
C3/T	0,9857	0,8980	0,8484	0,8069	0,7547	0,7407	0,7259

Chapitre III : Résultats et Discussion

Tableau 05 : les valeurs de l'énergie liée à l'excrétion U

Temps (j)	0	7	14	21	28	35	42
C1/T	0,9829	1,2632	1,2219	1,4794	1,3284	0,8799	1,0289
C2/T	0,9170	1,3625	1,2334	0,7497	1,1318	0,5733	0,8510
C3/T	1,1357	1,2802	0,8956	1,0287	1,2690	0,7004	0,9520

Tableau 06 : les différentes valeurs de contenu calorique C

Temps (j)	0	7	14	21	28	35	42
C1/T	1,0111	0,9890	0,9367	0,9318	0,9271	0,9336	0,9304
C2/T	0,9568	0,8644	0,7920	0,7338	0,7146	0,6998	0,7176
C3/T	0,9837	0,8821	0,8246	0,7771	0,7181	0,7019	0,6826

En général, une tendance identique des valeurs mesurées chez tous les groupes de test est observée pendant la période d'adaptation. Étant donné que les différents groupes de test sont soumis aux mêmes conditions expérimentales, les différentes mesures à savoir le GPJ, R_{mx} , R_{mt} et les rapports énergétiques relevés le long du cycle de contamination seraient donc le résultat direct de l'effet du polluant (Oxyfluorène) sur les spécimens contaminés. Par ailleurs, et durant le cycle de décontamination, les paramètres énergétiques mesurés chez les individus témoins restent toujours supérieurs à ceux enregistrés chez les spécimens détoxiqués. De fait, le rétablissement de l'équilibre de la balance énergétique semble être lent et la durée de

Chapitre III : Résultats et Discussion

détoxification resta probablement insuffisante pour que les poissons puissent reprendre leur état d'équilibre énergétique.

Selon (**Amiard *et al.*,2008**), plusieurs travaux relatent l'utilisation des biomarqueurs bioénergétiques dans le cadre d'expérimentations en laboratoire ou d'études en milieux naturels en démontrant la pertinence de les utiliser comme un signal précoce de l'altération de l'état de santé des organismes et de la qualité des écosystèmes aquatiques (marins et continentaux). Cependant, l'utilisation des biomarqueurs en relation avec le métabolisme énergétique en tant que marqueur de contamination est relativement limitée et ce pour de multiples raisons. Quel que soit le biomarqueur considéré, il apparaît clairement qu'indépendamment de tout effet de contamination, des facteurs intrinsèques comme l'âge ou l'état reproducteur mais également des facteurs environnementaux tels que la température influencent les réponses de ces biomarqueurs (**Lagadic *et al.*, 1997; Amiard *et al.*, 2008; Hélène *et al.*, 2003**). Une connaissance approfondie des modèles biologiques employés est donc prérequis.

III.3. Étude de l'effet du polluant sur la biométrie

Des mesures biométriques peuvent être utilisées pour déterminer les indices de conditions chez divers organismes tels que les poissons (**Amiard *et al.*, 2008; Pieterse,2004; Genevieve, 2003; Kosmala, 1998**). Ainsi, 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 somatique RHS et RGS (**Dongmezaet *et al.*, 2006; Kojadinovicet *al.*, 2006; Benjamin et Handy ,2006; Ferit *et al.*, 2006; Houck et Cech, 2004;Rocheet *al.*, 2003**).

La figure (8) représente les courbes hallométriques (relation tailles-poids) des tilapias étudiés avant le cycle de contamination.

Chapitre III : Résultats et Discussion

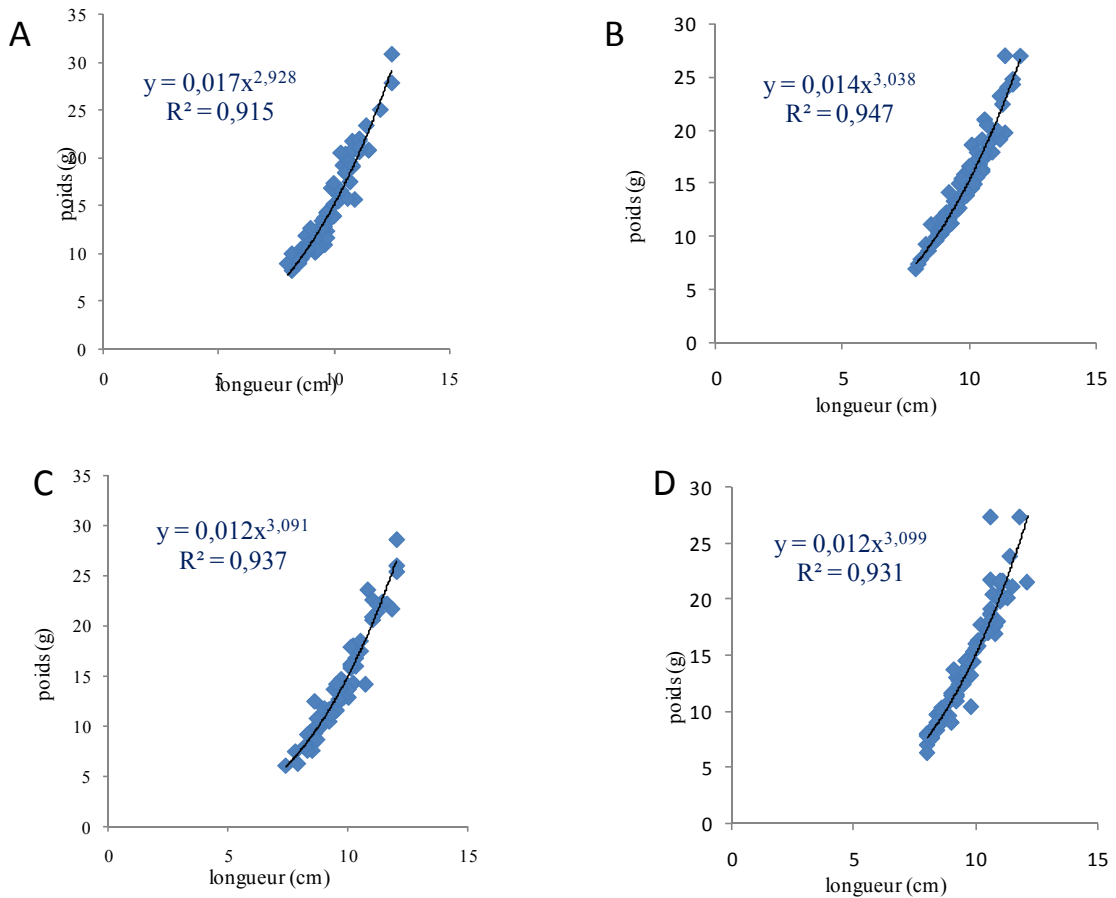


Figure 8: Relation taille (L) - Poids (P) des tilapias en adaptation.

A : Témoin, B : 1^{er} groupe, C : 2^{eme} groupe, D : 3^{eme} groupe

En général la variation du poids moyen (P_m) des poissons en fonction de la longueur moyenne (L_m) peut être décrite par la relation $P_m = a * L_m^b$ (Jones *et al.*, 1999; Irene *et al.*, 2004). Le cas où $b=3$ signifie que la variation taille-poids est isométrique traduisant le bon état de santé des spécimens, ce qui est le cas dans notre étude chez les poissons maintenus en adaptation.

Chapitre III : Résultats et Discussion

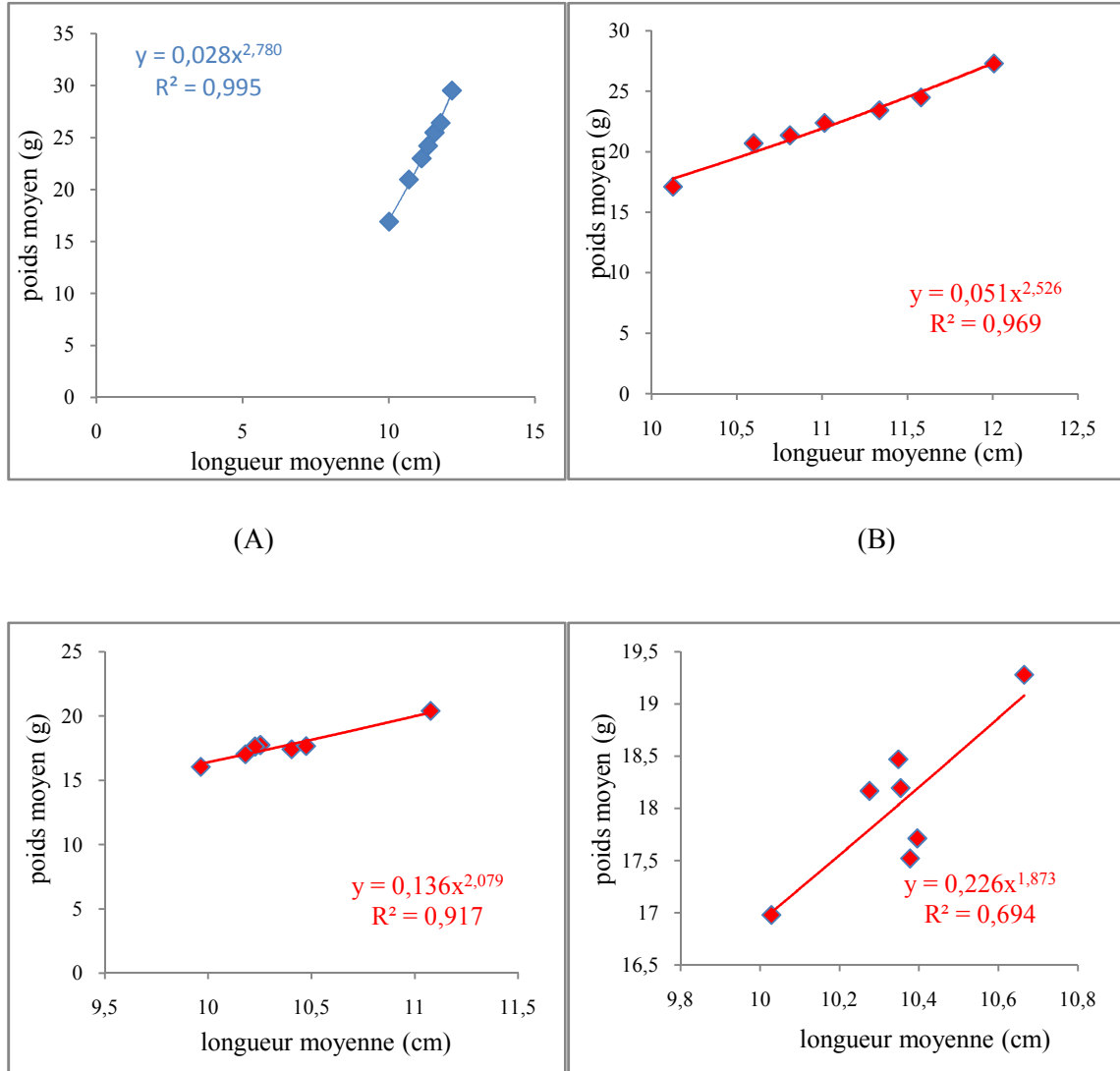


Figure 9: Relation taille (L) - Poids (P) des tilapias pour les quatre groupes de test.

(A): groupe témoins ; (B) : groupes contaminés par C1 ;
(C) : groupes contaminés par C2 ; (D) : groupes contaminés par C3.

D'après la figure (9), il est constaté que les individus tilapia témoins gardèrent une croissance toujours isométrique. L'effet de l'oxyfluorène étant très clair en considérant la variation des valeurs de l'indice b qui diminue proportionnellement avec le gradient concentration.

Le cas où b est inférieur à 3 implique que la variation en poids est très faible contre la longueur des individus conduisant à un retard de croissance avec amaigrissement des organismes.

Chapitre III : Résultats et Discussion

La figure (10) confirme encore le résultat ainsi discuté. Une nette différence de croissance entre les tilapias témoins et les tilapias exposées à l'oxyfluorène est relevée. La faible concentration en oxyfluorène (C1) semble avoir un effet modéré par rapport aux concentrations C2 et C3. Ces différences de croissance dans un groupe de poissons ayant presque un même poids initial peuvent s'expliquer par le comportement face à l'aliment et/ou la génétique (Sumpter et Jobling, 1995) et au stress dû à l'exposition au polluant. Selon, (Agbohessi *et al.*, 2014), la différence de croissance chez le poisson chat est fortement affectée par l'exposition aux pesticides, quels que soient le type de pesticide et la dose testée.

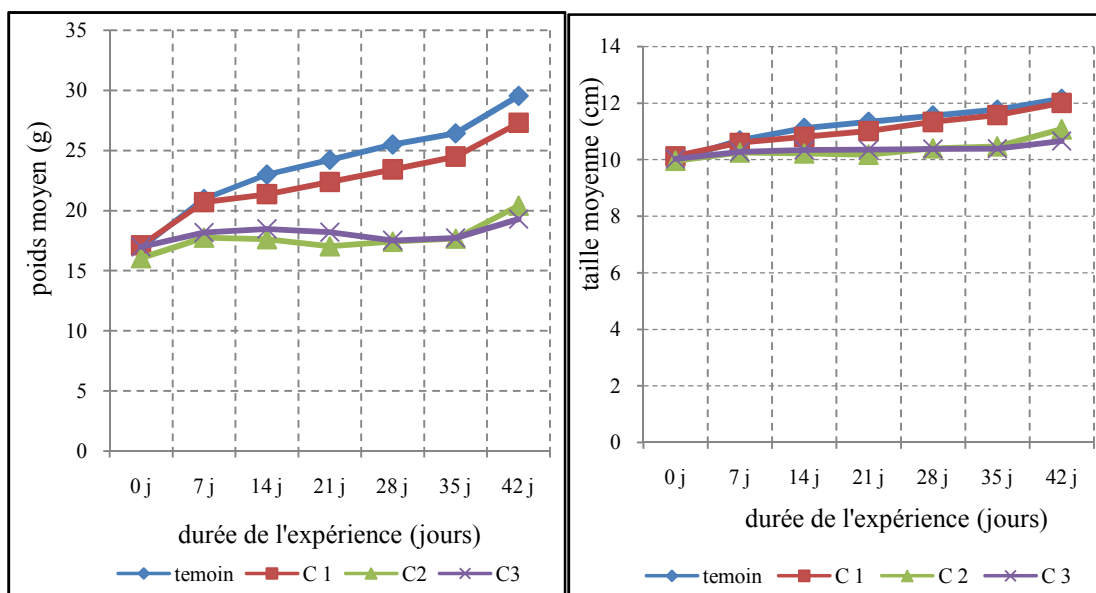


Figure 10:Évolution des poids moyens (Pm) et taille moyenne (Lm) des tilapias rouges durant la période d'étude.

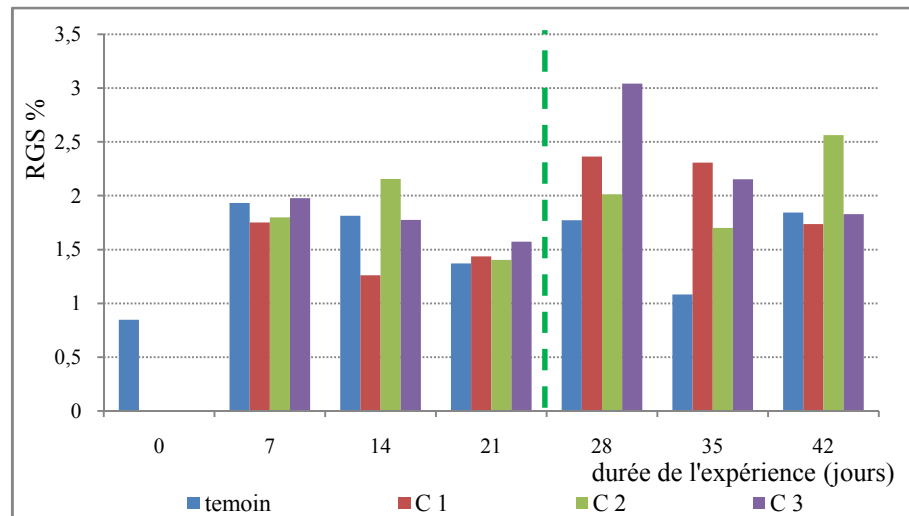
En effet une diminution de la condition peut être due au déséquilibre de la balance énergétique associée à l'exposition au xénobiotique 'oxyfluorène', sachant que, chez tous les organismes vivants, l'ensemble des processus biochimiques et physiologiques est étroitement dépendant de la quantité d'énergie disponible au niveau cellulaire.

Selon **Amiard *et al.***, une hausse des dépenses énergétiques pour le métabolisme de base pour faire face aux stress endurés peut conduire à une réduction de l'investissement énergétique envers la croissance et/ou la reproduction. Par ailleurs, sous l'effet d'un stress, y compris d'origine chimique, la réaction de l'organisme se traduit par un accroissement de la dépense

Chapitre III : Résultats et Discussion

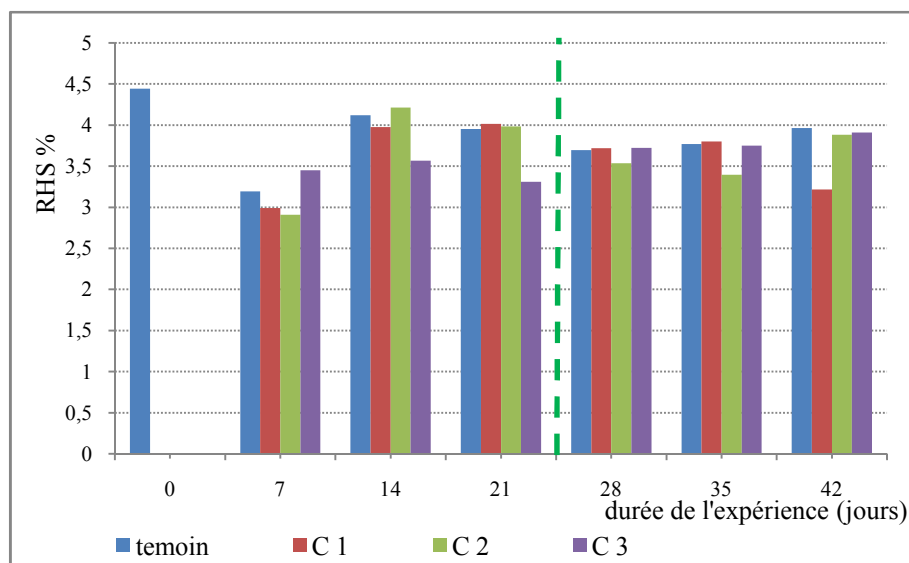
énergétique liée à la mise en place de mécanismes de compensation physiologique (**Lagadicet al., 1997**). Les contaminants chimiques peuvent aussi intervenir lors de digestion de l'aliment en altérant l'activité des enzymes digestives (dans notre cas la protéase) ce qui limite la capacité d'une espèce à maximiser sa prise énergétique (**Almeida et al., 2002; Gülüzar et Canli, 2007; Qing et al., 2003; Anulak et Yongsawatdigul, 2005**). Benjamin *et al.* (**Benjamin et Handy, 2006**), ont constaté aussi des retards de croissance chez des tilapias exposés au cuivre via la nourriture. De même, Ann Houck *et al.* (**Houck et Cech, 2004**), ont mesuré des taux de croissance très faibles chez des espèces *Orthodon microlepidotus* exposées au méthylmercure (MeHg) comparativement aux spécimens maintenus comme témoins. De par ailleurs, **Marchand et al., 2004** dans leurs études ont révélé une diminution générale des facteurs de conditions chez des poissons plats *Platichthys flesus* prélevés dans des estuaires impactés en comparaison à ceux d'un estuaire de référence.

La figure (11) montre l'effet de l'oxyfluorène sur les rapports somatiques RHS et RGS.



(A)

Chapitre III : Résultats et Discussion



(B)

Figure 11 :Etude de l'effet de l'oxyfluorène sur les rapports somatiques

(A) : Rapport gonadosomatique, (B) Rapport hépathosomatique

Aucune corrélation n'est relevée entre le RGS et les concentrations testées en Oxyfluorène. Aussi, les variations en fonction du temps sont très variables soit en présence ou absence du polluant.

Par ailleurs, la dose en polluant et la durée d'exposition n'avaient pas un effet significatif sur le RHS.

Pieterse(Houck et Cech, 2004) dans son étude observa une diminution du RGS de *Oreochromismossambicus*, exposé au cuivre par rapport aux individus témoins(Kojadinovic et al., 2006), dans ses études, ont relevé des corrélations à la fois positives et négatives entre les rapports somatiques (RHS et RGS) et le niveau des métaux traces (Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb, Se, Zn) accumulés chez différentes espèces de poissons (Espadon, Truite, Bonite...). De même, ils n'ont relevé aucune dépendance entre le RGS mesuré chez la truite et le niveau d'accumulation des différents éléments traces.

Chapitre III : Résultats et Discussion

Les paramètres biométriques mesurés chez les poissons se sont révélés simples à utiliser dans notre étude. Cependant ce type d'indices n'est pas considéré comme un biomarqueur au sens strict de la définition. Ils ont été mesurés en première intention car ils sont simples à réaliser, de faible coût et peuvent fournir des informations sur l'impact potentiel des polluants (Fernandes *et al.*, 2006; Kosmala, 1998; Roche *et al.*, 2003).

III.4. Résultats des analyses biochimiques

III.4.1. L'activité catalase

Les résultats relatifs au dosage de la catalase (CAT) aux niveaux du foie des poissons tilapias sont représentés dans les figures (12)

En général, une augmentation de l'activité CAT est observée chez les individus exposés à l'oxyfluorène. Comparativement aux individus témoins, ces derniers n'ont montré aucun changement significatif de leur activité CAT et cela le long du cycle expérimental.

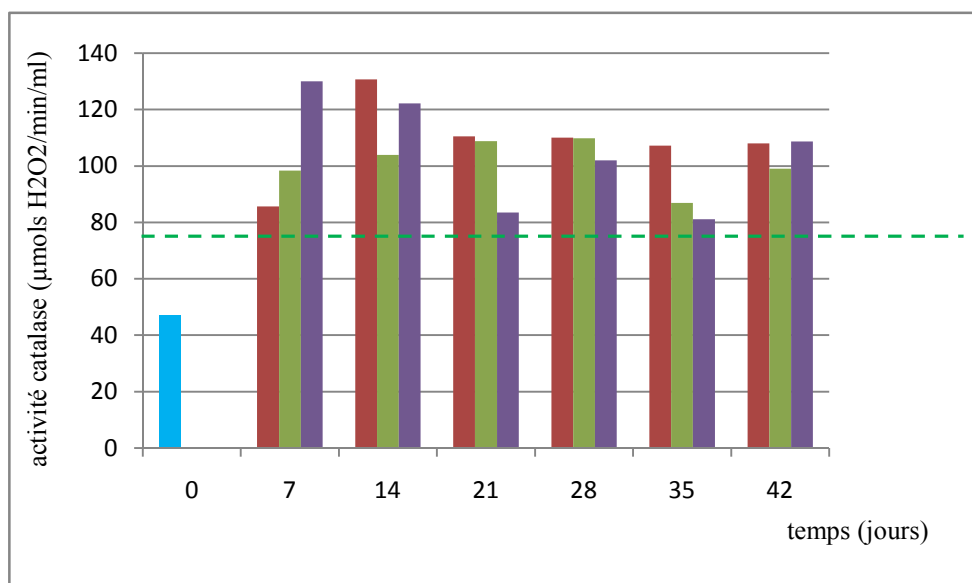


Fig 12: Étude de l'effet de l'oxyfluorène sur l'activité de la catalase dans le foie des tilapias

Une augmentation proportionnelle de l'activité catalase (CAT) est observée au 7^{ème} jour d'exposition à l'oxyfluorène. Ainsi, l'activité CAT (130,0268322 µMOLS H₂O₂/min/ml) maximale est mesurée sous l'effet de la forte concentration C3.

Chapitre III : Résultats et Discussion

Du 7^{ème} au 21^{ème} jour d'exposition à l'oxyfluorène, la concentration C3 semble avoir un effet inhibiteur sur l'enzyme antioxydante CAT.

L'induction CAT sous l'effet de la concentration C2 est proportionnelle avec la durée d'exposition. Le maximum d'activité CAT est atteint à la fin du cycle de contamination 21j. Par ailleurs, l'effet modéré de la concentration C1 sur l'induction de l'enzyme antistress oxydatif, observé au 7^{ème} jour d'exposition (CAT=98,37 $\mu\text{mols H}_2\text{O}_2/\text{min/ml}$), s'est amplifié au 14^{ème} (CAT=130,69 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min/ml}$) et 21^{ème} jour (CAT=110,49 $\mu\text{mols H}_2\text{O}_2/\text{min/ml}$). La relation dose-durée/effet étant positive.

Par ailleurs, les activités CAT mesurées chez les poissons détoxifiés des concentrations C1, C2, et C3, restèrent identiques à celles relevées à la fin du cycle de contamination. Au 35^{ème} jour de l'expérience (14j de décontamination) l'activité CAT des groupes C2 et C3 se rapprocha à celle des témoins, nonobstant, les valeurs relevées à la fin du cycle de décontamination démontrent la non réversibilité des mécanismes physiologiques pour le retour à l'homéostasie. Le résultat étant le signe d'une contamination précédente.

Dans les systèmes biologiques, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont produites en permanence par divers mécanismes impliquant des composés endogènes ou exogènes comme des xénobiotiques (**Amiard et Claude, 2008; Fernandes et al., 2006; Roche et al., 2003; Peixoto et al., 2006**). De plus les polluants chimiques sont d'importants producteurs de ROS (**Gülüzar et al., 2006; Fernandes et al., 2006; Gülüzar et Canli, 2007**). En effet les xénobiotiques connus pour leurs propriétés redox, comme les métaux de transition, induisent la formation de peroxyde d'hydrogène, des radicaux superoxydes...générant le stress oxydant (**Gülüzar et al., 2006; Gülüzaret Canli, 2007; Sanchez et al., 2005**). La catalase CAT (enzyme antioxydante) est une hémoprotéine présente au niveau des peroxysomes qui participent à la défense contre les dérivés de l'oxygène.

Vu les caractéristiques, la sensibilité de l'enzyme et la facilité du dosage de cette dernière, plusieurs auteurs qualifient la catalase comme un biomarqueur sensible dans l'approche de biomonitoring des écosystèmes aquatiques (**Gülüzar et al., 2006; Gülüzaret, 2007; Peixoto et al., 2006; Sanchez et al., 2005; Yuanyuan et al., 2006**).

Chapitre III : Résultats et Discussion

III.4.2. La protéase

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure (12)

Le dosage de l'activité protéase dans l'intestin des poissons (fig 12), mit en évidence une diminution d'activité de l'enzyme digestive chez les individus exposés au xénobiotique (Oxyfluorène) aux différentes concentrations atteignant des activités inférieures à celles mesurées chez les témoins et ce le long du cycle de contamination. La relation dose/effet n'étant pas claire. Aussi, la déplétion de l'activité digestive continue jusqu'au 7^{ème} jour de la détoxification des poissons (28j) et la durée d'exposition semble avoir un effet considérable.

Du 35^{ème} jour à la fin du cycle de décontamination, les individus tilapia antérieurement contaminés montrent une reprise d'activité digestive. Néanmoins, la durée de détoxification ne semble pas suffisante pour que la protéase retourne à la normale activité.

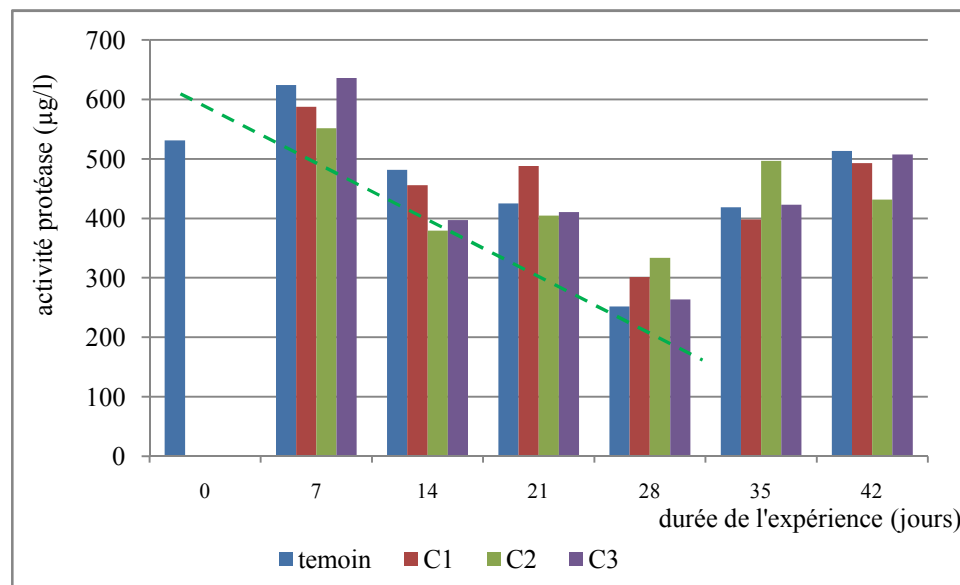


Figure 13 : Variation de l'activité protéase durant la période expérimentale

Ranilson et al (Ranilson *et al.*, 2005), dans leur étude sur les tilapias nilotica ont observé une inhibition de l'activité protéase sous l'effet des ions Cd^{2+} , Al^{3+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} et Co^{2+} , cependant leurs expériences ont été menées in vitro.

Chapitre III : Résultats et Discussion

Par ailleurs, une synthèse des résultats expérimentaux regroupés par Amiard et al(**Amiard et Claude,2008**), donne des exemples d'inhibition de différentes enzymes digestives de différents organismes aquatiques exposés aux polluants métalliques et organiques y compris la contamination mixte.

INTRODUCTION

Chapitre I :
Revue bibliographique

Chapitre II :
Matériels et méthodes

Chapitre III :
Résultats et discussions

CONCLUSION

Annexes

Références bibliographiques

CONCLUSION

Ce présent travail a été réalisé dans le but d'étudier l'impact d'utilisation de pesticides sur la dégradation des milieux aquatiques et d'exploiter les outils biologiques (bioindicateurs, biomarqueurs) dans le cadre du suivi de la santé l'environnement et des écosystèmes aquatique.

Le poisson tilapia d'eau douce « *OreochromisSp* » a été choisi dont l'objectif d'étudier l'impact de la substance active «oxyfluorfène » sur son état physico-chimique, paramètres biométriques, bioénergétiques et surtout la contribution à la recherche des biomarqueurs comme réponse susceptible d'apporter une information intégrée sur l'état de santé de l'environnement.

D'après nos résultats, il ressort que :

- Vu la qualité physico-chimique(%H, %MM, %MO et pHde l'aliment sont respectivement ,9,33 ; 24 ; 66,67 et 6,61) et bactériologique de l'aliment, on en conclu que ce dernier ne présente pas un risque pour l'état de santé des individus.
- Que l'effet de l'oxyfluorfène été remarquable sur les excrétiens azotées en particulier l'azote ammoniacal Chez tous les groupes contaminés.
- D'après les paramètres biométriques on remarque une diminution de la croissance chez les groupes contaminés par apport ou témoin. C'est le résultat direct d'un déséquilibre de la balance énergétique et de la diminution de la prise alimentaire, liée à l'effet de l'oxyfluorfène.De fait, ces facteurs constituent les premiers paramètres à prendre en considération, et ceci plus particulièrement dans le cadre des programmes de biosurveillance de longue durée. Par ailleurs, il est recommandé d'intégrer aux indicateurs bioénergétiques, la mesure (ou la détermination) d'indices généraux de condition mais aussi le statut reproducteur des organismes.
- la perturbation de l'enzyme digestive « protéase » est à l'origine de l'atteinte de la biométrie et du métabolisme bioénergétique suite à l'exposition ou l'oxyfluorfène.
- Aussi l'augmentation de l'enzyme antioxydante CAT chez les groupes contaminés a montré des atteintes dans leur activité sous l'effet del'oxyfluorfène durant tout le cycle expérimentale.

CONCLUSION

Le suivi de l'impact potentiel des contaminants sur l'activité des enzymes digestives est un paramètre intéressant présentant une pertinence écologique forte, car elles jouent un rôle crucial sur les processus d'assimilation de la nourriture. Une diminution de la digestion pourra induire une diminution de la croissance et de la reproduction avec un impact possible sur le maintien de la population.

Pour terminer, il serait intéressant de poursuivre cette étude pour essayer d'étudier d'autres biomarqueurs de stress.

A

Abdel El-Sayed2006 : tilapia culture: oceanography department, faculty of science, alexandria university, alexandria, egyptcabi publishing

Agbohessi TP, ImorouToko I, N'tcha I, Geay F, Mandiki SNM, Kestemont P. 2014. Exposure to agricultural pesticides impairs growth, feed utilization and energy budget in African Catfish *Clariasgariepinus*(Burchell, 1822) fingerlings. *International AquaticResearch*, 6(4): 229 - 243. DOI: 10.1007/s40071-014-0083-5

Akeem BabatundeDauda, Suleiman Omale Yakubu1, AbdulfataiOlubukolaOke, 2014 :curbing the menace of prolific breeding in “aquatic chicken” (tilapia): a way out to improve fish production in Nigeria, *n y sci j* 2014;7(4):112-118]. (issn: 1554-0200).

Aldoghachi1 Jasim M.A, MotiorRahman.M, Yusoff .I and M. Sofian-Azirun1,2016 : acute toxicity and bioaccumulation of heavy metals in red tilapia fish,the journal of animal & plant sciences, 26(2): 2016, page: 507-513

Aldoghachi1 M. A. Jasim, M. Motior Rahman. I. Yusoff and m. Sofian-Azirun, 2016.Acute toxicity and bioaccumulation of heavy metals in red tilapia fish. The journal of animal & plant sciences, 26(2), page: 507-513

Allison, G. 2015. Réponse aux stress multiples chez les poissons: effets croisés de la température et des cocktails de pesticides (thèse de doctorat). 2015. p.28

Almeidaa J.A., Dinizb Y.S., Marquesa S.F.G., Faineb L.A., Ribasc B.O., Burneikob R.C., Novellib E.L.B., 2002. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromisniloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environment International* 27, 673–679, Elsevier.

Amiard Jean-Claude., Claude Amiard-Triquet., 2008. Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Edition Tec et Doc Lavoisier. ISBN : 978-2-7430-1017-1.

Ana Rosa Linde-Arias., Alan F. Inácio., Carla de Albuquerque., Marina M. Freire., Josino C. Moreira., 2008.Biomarkers in an invasive fish species, *Oreochromisniloticus*, to assess the effects of pollution in a highly degraded Brazilian River. *Science of the total environment* 399, 186 – 192. Elsevier.

Ann Houck., Joseph J. Cech Jr., 2004. Effects of dietary methylmercury on juvenile Sacramento blackfish bioenergetics. *Aquatic Toxicology* 69, 107–123. Elsevier.

AntónioFigueiredo-Fernandes, Jorge V. Ferreira-Cardoso, Sofia Garcia-Santos,Sandra M. Monteiro2, João Carrola2, Pedro Matos2 And AntónioFontainhas-Fernandes,2007 :histopathological changes in liver and gill epithelium of nile tilapia, *oreochromisniloticus*, exposed to waterborne copper1, *pesq. vet. bras.* 27(3):103-109, março 2007

AnulakWorratao., JirawatYongsawatdigul., 2005. Purification and characterization of transglutaminasefrombTropical tilapia (*Oreochromisniloticus*). *Food Chemistry* 93, 651–658. Elsevier.

B

Barillet Sabrina, 2007.Toxicocinétique, toxicité chimique et radiologique de l'uranium chez le poisson zebre (*daniorerio*). Thèse de doctorat, université Paul Verlaine de Metz, 475p.

Benjamin J. Shaw., Richard D. Handy., 2006. Dietary copper exposure and recovery in Nile tilapia, *Oreochromisniloticus*. *AquaticToxicology* 76, 111–121. Elsevier.

C

C.E. (1991). Directive du conseil du 15 juillet 1991 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques (91/414/CEE), *Journal officiel* n° L 230 du 19/08/1991: p. 0001 – 0032.

C.E. (2008a). Directive 2008/934/CE. Décision de la commission du 5 décembre 2008 concernant la non-inscription de certainessubstances actives à l'annexe I de la directive 91/414/CEE du Conseil et le retrait des autorisations de produitsphytopharmaceutiquescontenant ces substance [notifiéesous le numéro C (2008) 7637].

C.E. (2008b). Règlement (CE) no 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des

mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) no 1907/2006 E.C. (2004). Commission staff working document on implementation of the Community Strategy for Endocrine Disrupters - a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife (COM(1999) 706)).
Reference : SEC(2004) 1372. European Commission, Brussels .

Calvet.R,barriuso .E,Bedos.C,Benoit.P,Charnnay.M .P,coquet .Y,2005 . les pesticides dans le sol,consequences agronomiques et environnementales.franceagricole.ISBN :2-85557-1119-7

Camiré M. 2007. Effets de l'exposition chronique aux pesticides sur le statut physiologique du poisson d'eau douce. Mémoire de maîtrise, Faculté de Biologie, Université du Québec à Montréal, Canada, p. 82.

chapman frank, assistant professor, department of fisheries and aquatic sciences; cooperative extension service, institute of food and agricultural sciences, university of florida, gainesville, 32611.

Code international de conduite pour la distribution et l'utilisation des pesticides (version révisé) (FAO, 2003).

D

Dautremepuits, C., Betouille, S., Vernet, G., 2002. Antioxidant response modulated by copper in healthy or parasitized carp (*Cyprinus carpio* L.) by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). Biochim. Biophys. Acta 1573,4–8.

Delattre J .,beaudeux J.L &bonnefont R.,2005 .radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques .lavoisieredition TEC &DOC ,éditionsmedicales internationales,paris,1-405.

DIRECTIVE 2000/60/ce du parlement européen et du conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau (jo l 327 du 22.12.2000, p. 1)*Ecotoxicol Environ Saf*71, 86-93.

E

E.C. (2007). "Community Strategy for Endocrine Disruptors - a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife", SEC (2007) 1635. Third progress report on the implementation of the Strategy during the period 2004-2006.

E.C. (2011). Technical Guidance For Deriving Environmental Quality Standards. Guidance Document No. 27 for the Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive (2000/60/EC). Technical Report - 2011 - 055. http://circa.europa.eu/Public/irc/env/wfd/library?l=/framework_directive/guidance_documents/tgdeqs_cis-wfd/_EN_1.0_&a=d.

EFSA (2007). Draft Assessment Report - public version - Initial risk assessment provided by the rapporteur Member State Spain for the existing active substance OXYFLUORFEN of the third (part B) of the review programme referred to in article 8(2) of council Directive 91/414/EEC. European Food Safety Authority.

EFSA (2010a). Additional Report to Draft Assessment Report - public version - Risk assessment provided by the rapporteur Member State Spain for the existing active substance OXYFLUORFEN upon resubmission in the framework of the accelerated procedure in accordance with Commission Regulation (EC) No 33/2008. European Food Safety Authority.

Euloge Dongmeza., Perumal Siddhuraju., George Francis., Klaus Becker., 2006. Effects of dehydrated methanol extracts of moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves and three of its fractions on growth performance and feed nutrient assimilation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* (L.)). *Aquaculture* 261, 407–422. Elsevier.

F

FAO, 2012. Fiches d'information -Espèces aquatiques cultivées -*Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). Département des pêches et de l'aquaculture de la FAO.

Farombi . E. O. Adelowo, O. A., and Ajimoko .Y. R. ; 2007. Biomarkers of Oxidative Stress and Heavy Metal Levels as Indicators of Environmental Pollution in African Cat Fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. *Environmental Research and Public Health* 4(2), 158-165

Favier A, (2003). Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108-115.

Ferit Rad., Sezai Bozaoğlu., Serap Ergene Gözükar., Arzu Karahan., Gülderen Kurt., 2006. Effects of different long-day photoperiods on somatic growth and gonadal development in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture* 255, 292–300. Elsevier.

ferreirajt (1998) personal communication. randafrikaansuniv., po box 524, auckland park, 2006

Figueiredo-Fernandes. A, A. Fontainhas-Fernandes., F. Peixoto., E. Rocha., M.A. Reis-Henriques., 2006. Effects of gender and temperature on oxidative stress enzymes in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to paraquat. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 85, 97–103. Elsevier.

Fitzgerald wj :1979. l'aquaculture des tilapias du développement a la recherche (livre biblio) red-orange tilapia – a hybrid that could become a world favorite. *fish farming inst.* 6 26-27.

Flammarion P., Devaux A., Garric J., 2000. Marqueurs biochimiques de pollution dans les écosystèmes aquatiques continentaux ; exemples d'utilisation et perspectives pour le gestionnaire. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* 357/360, 209-226.

Foncrev Med Liege ,2007. Le stress oxydant,; 62 : 10 : 628-638.

G

Galman, o. r., and r. r. avtalion. 1983. a preliminary investigation of the characteristics of red tilapias from the philippines and taiwan. pages 291

Garidou Cécile., 1994. Quantification des rejets d'une ferme piscicole de Loup (*Dicentrarchus labrex* L). Bilan de mass : N, P et C. GIE recherche aquacole Station IFREMER : 209p

Geffard Alain., 2001. Réponses du biota à la contamination polymétallique d'un milieu estuarien, la Gironde : Exposition, imprégnation, induction d'une protéine de détoxification, la métallothionéine, impact au niveau individuel et populationnel. Thèse de doctorat, université de Nantes, 252p.

Geffard Olivier., 2001. Toxicité potentielle des sédiments marins et estuariens contaminés : évaluation chimique et biologique, biodisponibilité des contaminants sédimentaires. Thèse de Doctorat, université de Bordeaux I, 376 p.

GenevieveDeviller., 2003. Traitement par lagunage a haut rendement algal (LHRA) des effluents piscicoles marins recycles : évaluation chimique et écotoxicologique. Thèse de doctorat, Université Montpellier I, 172p.

Gül, B., Belge-KurutaC, E., Yıldız, E., Bahan, A., Doran, F., 2004. Pollution correlated modificationsof liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake,Turkey. *Environmental International*. 30, 605–609.

Gülüzar A., Ozlem A., Seyhan T., Mustapha C., 2006. Response of catalase activity to Ag^+ , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} in five tissues of freshwater *Oreochromisniloticus*.*Comparative Biochemistry and Physiology* 143, 218-224. Elsevier.

GülüzarAtli., Mustafa Canli., 2007. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromisniloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. Elsevier.

H

Hagar S. Dighiesh , Mohamed A. Eldanasoury , Saeed A. Kamel , Safaa M. Sharaf, 2019. Toxicity of Water Soluble Fractions of Petroleum Crude Oil and its Histopathological Alterations Effects on Red Tilapia Fish.*CATRINA*,18,25-31

Haleng.J (1), J. Pincemail (2), J.O. Defraigne (3), C. Charlier (4), J.P. Chapelle (5),2007 :

Hansen J.A., Lipton J., Welsh P.G., Cacula D., 2004. Reduced growth of rainbow trout (*Oncorhynchusmykiss*) fed a live invertebrate diet pre-exposed to metal-contaminated sediments. *Environ ToxicolChem* 23, 1902-1911.

Hudson BI, Wendt T, Bucciarelli LG, et al.Diabetic vascular disease: it's all the RAGE. *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7, 1588-1600.

I

Ibrahim imorou Toko1, O.E. Rodrigue Pelebe1, Roland Tonato1, N. Léa Guedegba, T. Prudencio Agbohessil Et Patrick Kestemont2 : Indices biométriques et paramètres de croissance du tilapia *Oreochromisniloticus*(Linnaeus, 1758) exposé aux pesticides agricoles dans les retenues d'eau du Nord-Bénin, *international journal of biological and chimecalscience*, .12(3): 1401-1414, June 2018.

J

J.A Almeida., E.L.B Novelli., M Dal Pai Silva., R Alves Junior., 2001. Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Environmental Pollution* 114, 169-175. Elsevier.

Jessica Kojadinovic., Michel Potier., Matthieu Le Corre., Richard P. Cosson., Paco Bustamante., 2006. Bioaccumulation of trace elements in pelagic fish from the Western Indian Ocean. *Environmental Pollution* 1-19. Elsevier.

Joyce J. Evans., Craig A. Shoemaker., Phillip H. Klesius., 2000. Experimental *Streptococcus iniae* infection of hybrid striped bass (*Morone chrysops* X *Morone saxatilis*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) by nares inoculation. *Aquaculture* 189, 197–210. Elsevier.

K

Kalisz .H. M, Woodz D. A and. Moore d,1989. some characteristics of extracellular proteinases from *coprinus cinereus myca/*. *res.* 92 (3): 278-285 *grealbrilain*278

keddal, h et yao n'dri, j. (2007). impacts de l' intensification agricole sur la qualite des eaux de surface et des eaux souterraines. *hte*, 1(138), 13– 29.

Kojadinovic Jessica., Michel Potier., Matthieu Le Corre., Richard P. Cosson., Paco Bustamante., 2006. Bioaccumulation of trace elements in pelagic fish from the Western Indian Ocean. *Environmental Pollution* 1-19. Elsevier.

Kosmala A., 1998. Evaluation écotoxicologique de l'impact des effluents de stations d'épuration sur les cours d'eau : intérêt d'une approche intégrée. Thèse de doctorat, université Metz, 189 p.

L

Lagadic Laurent., Caquet Thierry., Amiard Jean-Claude., Ramade François., 1998. Utilisation des Biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. Edition Tec et Doc Lavoisier Paris, ISBN : 2-7430-0230-1.

Lagadic Laurent., Caquet Thierry., Amiard Jean-Claude., Ramade François., 1997. Biomarequers en écotoxicologie, Aspects fondamentaux. Edition Masson, Paris, ISBN : 2-225-83053-3 ; ISSN : 1275-0026.

Lahaye J. 1980. Les cycles sexuels chez les poissons marins. *Oceanis*, 6, 7, 637-654.

Leonard L. Lovshin, 1998. Criteria for Selecting Nile Tilapia and Red Tilapia for Culture. Department of Fisheries and Allied Aquacultures Alabama

Liao, I. And Chang, s. (1983). studies on the feasibility of red tilapia culture in saline water. proceeding of the international symposium on tilapia in aquaculture. telavive university . israel. fishelson, I. & yaran, z., pp. 524-533.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr N.J., Randall R.J., 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.

Lundberg Ivar, Kreuger Jenney et Jonhson Anders. 1955. pesticides et eaux de surfaces : etude sur la situation concernant la pollution des eaux de surfaces par des residus des pesticides dans les pays nordiques , en allemagne et aux pays bas , et les problemes associés a la contamination par les pesticides. Edition Conseil de l' europe. ISBN : 92-871-2776-X .

M

Marchand J, Quiniou L, Riso L, Thebaut M.T et Laroche J, 2004. Physiological cost of tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast. *AquatToxicol* 70, 327-343.

Martina Bocci., 1999. Modelling the growth of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) feeding on natural resources in enclosures in Laguna de Bay (Philippines). *Ecological Modelling* 119, 135-148. Elsevier.

Martins Irene., José Costa Pereira., Jaime A. Ramosa., Sven Erik Jørgensen., 2004. Modelling the effects of different quality prey fish species and of food supply reduction on growth performance of Roseate Tern chicks. *Ecological Modelling* 177, 95–106. Elsevier.

Meknachi abdellah, 2009 : utilisation du poisson tilapia *oreochromis niloticus* et la moule *mytilus galloprovincialis* comme bioindicateurs du niveau de pollution par les metaux traces : modelisation de la bioaccumulation, memoire de magister.

N

Narbone, JF ., & Michel, J., 1992 : The use of biomarkers in assesement of contamination in marine ecosystems. fundamental approach and applications. *mediteranean action plan. technical reports series*, 78 : 1-20.

NikNurasyikinNik Mohammad Azmi1, MohamadSofi Abu Hassan,2018.Assessment of metals concentration in tilapia (*oreochromissp.*) and estimation of daily intake by malaysian (penilaiankepekatanlogamdalam tilapia (*oreochromissp.*) dananggaranpengambilanharianoleh orang malaysia) .malaysian journal of analytical sciences . *malaysian journal of analytical sciences, vol 22 no 4 : 594 - 604*[11]

Norbert Zonneveld , Rasyidfadholi ,1991 : feed intake and growth of red tilapia at different stocking densities in ponds in indonesia, aquaculturevolume 99, issues 1–2, 15 november 1991, pages 83-94.

NurulnadiaMohdYusoff ,SitiNurtahirah Jaafar1, Noor Azhar Mohamed Shazili,Oxidants, Antioxidants and Oxidative Stress,2008 : A. Gvozdjaková (ed.), Mitochondrial Medicine. 19 © Springer Science + Business Media B.V. 2008.

P

Pagand Pascal., 1999. Traitement des effluents piscicoles marins par lagunage a haut rendement algal. Thèse de doctorat, université de Montpellier I, 220p.

Paris-Palacios, S., Biagianti-Risbourg, S., Vernet, G., 2000. Biochemicaland (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachydaniorerio*(Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations ofcopper sulfate. *Aquat. Toxicol.* 50, 109–124.

Peixoto F., Alves-Fernandes D., Santos D et Fontainhas-Fernandes A., 2006. Toxicological effets of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromisniloticus* .J. Pesticide Biochemistry and Physiology 85, 91-96. Elsevier.

Peres.G. objet et méthodes générales de l'écotoxicologie aquatique, bull. acad. vét. de France, 1988, 61, 327-340

Pieterse G.M., 2004.Histopathological changes in the testis of *Oreochromismossambicus* (Cichlidae) as a biomarker of heavy metal pollution.Thesis of Philosophiae Doctor in Aquatic health, Rand Afrikaans Univ, 153p.

Popma T, Masser M, 1999 : tilapia : life history and biology, SRAC Publication No. 283.stoneville.MS : Southern Regional Aquaculture .

Q

Qing Pana., Sheng Liu., Yong-Gang Tan., Yin-Zuo Bi., 2003. The effect of chromium picolinate on growth and carbohydrate utilization in tilapia, *Oreochromisniloticus*_ *Oreochromisaureus*. *Aquaculture* 225, 421–429.Elsevier.

R

R.E Jones., R.J Petrell., D Pauly., 1999. Using modified length–weight relationships to assess the condition of fish. *Aquacultural Engineering* 20, 261–276. Elsevier.

R.S.V Pullin, R.H lowe-McConnell,1982 : tilapia culture ,international center for living aquatic reasechers managements ,manila,ISBN :ISBN 01154389

Ramadefrançois, 2007. Introduction à l’ecotoxicologie :fondements et applications. Edition Tec et Doc Lavoisier. ISBN : 978-2-7430-0944-1.

Ranilson S., Eduardo J., Rodrigo B., Patricia M., Maria E., Luana C., Coelho L, 2005. Alkalineproteinasefromintestine of Nile tilapia (*Oreochromisniloticus*). *ProcessBiochemistry* 40, 1826-1834. Elsevier.

Roche. Hélène, Astrid Buet., François Ramade., 2003. Caractéristiques écophysiologiques d’une population d’anguilles de camargue exposée à une pollution clandestine par des polluants organiques persistants. *Rev. Écol. (Terre Vie)*, 58, 2003.

RoshadaHashim,Alexander S. C. Chong,Nurulhuda Ahmad Fatan,Norashikin Layman &Ahyudin Ali ,2002 : production of hybrid red tilapia, oreochromismossambicus × o. niloticus, at varying stocking densities in portable canvas tanks,journal of applied aquaculture ,volume 12, 2002 - issue 3

Ruas CB, CarvalhoCdos S, de Araujo HS, Espindola EL, Fernandes MN, (2008). Oxidative stress.

S

Saber A. El-Shafai., Huub J. Gijzen., Fayza A. Nasr., Fatma A. El-Gohary., 2004. Microbial quality of tilapia reared in fecal-contaminated ponds. *Environmental Research* 95, 231–238.Elsevier.

Saber A. El-Shafaia., Fatma A. El-Goharya., Fayza A. Nasra., N. Peter van der Steenb., Huub J. Gijzenb., 2004. Chronic ammonia toxicity to duckweed-fed tilapia (*Oreochromisniloticus*). *Aquaculture* 232, 117–127. Elsevier.

Sanchez W., Palluel O., Meunier L., Coquery M., Porcher J.M et Ait-Aissa S., 2005. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback : relationship with hepatic metal levels. *J. Environmental Toxicology and Pharmacology* 19, 177-183. Elsevier.

Sarah B., Rebecca L., Nilima G., Guttorm N., Dennis G., Miriam L, 2006. A comparison of contaminant in arctic and temperate fish: A modelling approach. *Chemosphere* 63, 1328-1341. Elsevier.

Shahidul Islam, Md. Tanaka.M. 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin*, 48, 624–649

Shailaja Ms , D'silva C, 2003 : evaluation of impact of pah on a tropical fish, *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers la chimosphère. 2003 décembre; 53 (8): 835-41.

Stellio Casas., 2005. Modélisation de la bioaccumulation des métaux traces (Hg, Cd, Pb, Cu et Zn) chez la moule *Mytilus galloprovincialis* en milieu méditerranéens. Thèse de doctorat, université Sud Toulon VAR, 314p.

Su Mei Wu , Mei-Jyun Shih, Yi-Chia Ho, 2007: toxicological stress response and cadmium distribution in hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.) upon cadmium exposure , biochimie et physiologie comparées, partie c 145 (218 – 226)

Sumpter J.P., Jobling S., 1995. Vitellogenesis as a biomarker of estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Perspect* 103, 173-178.

U

Umut Baykan., Gülüzar Atli., Mustafa Canli., 2007. The effects of temperature and metal exposures on the profiles of metallothionein-like proteins in *Oreochromis niloticus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 23, 33–38. Elsevier.

US EPA (2002) Reregistration eligibility decision (RED) for Oxyfluorfen Case No. 2490. Pesticides and toxic substances. US Environmental Protection Agency Office of Prevention. https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/oxyfluorfen_red.pdf.

V

Van der Oost, R . Beyer, J . Nico P.E, V .(2002). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13 , 57- 149

villegas, c.t., (1991). growth and survival of *oreochromismossambicus*, *oreochromisniloticus* and their fl hybrids at various salinities. seaedecasian aquaculture xiii (1): 3 - 5.

Virginie Ducrot., 2005. Compréhension et modélisation des relations entre les caractéristiques biologiques et écologiques et la sensibilité aux contaminants des communautés d'invertébrés benthiques : perspectives pour l'évaluation des effets des substances chimiques. Thèse de doctorat, Université de Metz, 384p.

Vovener de Verlands Edmond, 2012 : effet de la salinité sur la survie de l'hybride rouge du tilapia (*oreochromis* spp) etude de cas dans le lac Azuéli (étang saumâtre), faculté d'agronomie et de médecine vétérinaire, mémoire préparé pour l'obtention du diplôme d'ingénieur-agronome.

W

Watanabe W.O., K.E. French, B.L. 011a, D.H. Ernst and R.I. Wicklund, 1989. aquaculture of red tilapia (*oreochromis sp.*) in marine environments state of the art, aquacopifremeractes de colloque 9 pp 487498.

Y

Yuanyuan S., Hongxia Y., Jingfei Z., Ying Y.nHuahongS etXiaorong W., 2006. Bioaccumulation, depuration and oxidative stress in fish *Carassiusauratus* under phenanthrene exposure. J. Cemosphere 63, 1319-1327. Elsevier.

Z

Zakaria A. Mohamed., Ahmed A. Hussein., 2006. Depuration of microcystins in tilapia fish exposed to natural populations of toxic cyanobacteria: A laboratory study. Ecotoxicology and EnvironmentalSafety 63, 424–429.Elsevier.

ANNEXE-1

Le pesticide étudié

MARCANA :est un herbicide à base de l'oxyfluorène de contact agissant sur la plupart de dicotylédones et graminées annuelles,Sélectif sur oignon

Leur composition : 240g/l d'oxyfluorène



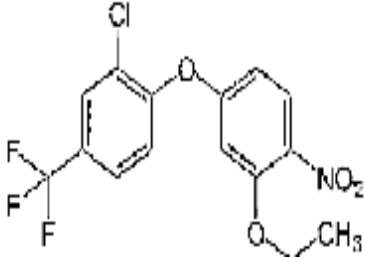
1.1. Identification de la substance

Substance chimique	Oxyfluorène
Autres dénominations/synonymes	2-Chloro-1-(3-ethoxy-4-nitrophenoxy)-4(trifluoromethyl) benzène
Nom comercial	GOAL
Numéro CAS	42874-03-3
Formule moléculaire	C ₁₅ H ₁₁ ClF ₃ NO ₄
Code SMILES	<chem>Clc2cc(ccc2Oc1ccc([N+](=O)[O-])c(OCC)c1)C(F)(F)F</chem>
Status	Usage général

1.2. Les propriétés physico- chimiques de l'oxyfluorène :

Il est soluble dans la plupart des solvants organiques, et faiblement soluble dans l'eau (<0,5 g/l à 25°C), il est fortement persistant dans le sol avec des temps de demi-vie qui diffèrent selon le type de sol.

Tableau I : Les propriétés physico-chimiques du l'oxyfluorféne

Molécule	Formule	Propriétés physico-chimiques
<p>Oxyfluorféne</p>		<p>Poids moléculaire = 361.7 [g/mol].</p> <p>Pression de vapeur = $2,6 \cdot 10^{-5}$ Pa à 25°C.</p> <p>Coefficient d'adsorption = 5450[L/kg]</p> <p>coefficient de partage Octanol-eau (log Kow)= : 4,86 à 18°C.</p> <p>Solubilité (eau) =: 0,116 mg/L à 25°C.</p> <p>Constante de dissociation (pKa)= : Ne se dissocie pas dans l'eau (99,2%).</p> <p>La solubilité dans d'autres solvants : facilement soluble dans la plupart des solvants organiques.</p> <p>La température de décomposition = 240 degrés C.</p>

ANNEXE (2)

Matériels non biologiques :



Bacs de dissection



creusets



Epuisette



Four à moufle



Trousse à dissection



tubes à essais



Aquariums en verre
(60 c m x 40c m x 40 cm)



Thermomètre



pH-mètre



Agitateur/plaque chauffante



Centrifugeuse



bain Marie



Balance de précision



dessiccateur



ichtyomètre

Annexe (3)

Analyses physico-chimiques et microbiologiques de l'aliment

Analyses physico-chimiques

1- Taux d'humidité

L'humidité dans un produit est définie comme étant la quantité d'eau absorbée ou adsorbée dans ce dernier, elle est déterminée selon le protocole ci-dessous

10g d'aliment (m_0) préalablement broyés sont placés dans une capsule en porcelaine pesée (m_c) et tarée. L'ensemble est mis dans l'étuve à 105°C pendant 2h

L'échantillon séché est refroidi dans un dessiccateur avant de déterminer sa masse finale (m_f)

$$\text{Expression de résultat : } \%H = \left[\frac{m_f - m_c}{m_0} \right] \times 100$$

$$\%H = 9,33 \%$$

2- Taux de matière minérale (MM) et organique (MO)

La masse totale d'un produit est la somme des trois formes suivante :

$$M_T = M_{eau} + MM + MO$$

Pour déterminer le pourcentage de la matière minérale (taux de cendre) L'échantillon séché (ou bien 10g d'un nouvel échantillon) est placé dans un four à moufle à une température °C jusqu'à calcination totale de la prise d'essai.

La pesée de la capsule avec les cendre (P_f) est faite après refroidissement de ces derniers dans un dessiccateur.

Le poids des cendre (MM) est :

$$MM = P_f - m_c$$

$$\%MM = \left(\frac{P_f - m_c}{m_o} \right) \times 100$$

Donc :

$$MO = MT - (M_{eau} + MM)$$

$$\%MO = 100 - (\%H + \%MM)$$

$$\%MM = 24 \%$$

$$\%MO = 66,67 \%$$

3-Détermination du pH

Le pH est déterminé par mixtion d'une certaine quantité d'aliment broyé (10%, 5% et 1%) avec de l'eau distillée. Le pH-mètre employé est à électrode en verre.

$$\text{pH} = 6,61$$

Analyse microbiologique de l'aliment

Préparation des dilutions

10g d'aliment sont broyés dans un Mix-bag avec 100ml d'eau distillée stérile, le filtrat récupéré étant la solution mère.

La dispersion des cellules bactérienne est assurée par le TSE comme diluant.

Après répartition de 9ml de diluant dans des tubes à vis préalablement stérilisés, 1ml de la solution mère (filtrat) convenablement homogénéisée, est introduit dans le premier tube, ainsi est obtenue une dilution à (1/10).

1ml est prélevé de la première dilution pour être complété au 9ml du diluant pour obtenir une dilution de (1/100). L'opération est reproduite pour la dilution (1/1000).

Recherche et dénombrement des coliformes totaux (CT) et fécaux (CF)

Tableau B.2 : Caractéristiques, milieux sélectifs et but de la recherche des *CT* et *CF*

Germe recherché	Caractéristiques	But de la recherche	Les Milieux sélectifs
<i>CT et CF</i>	<p><u>CT</u> : Entérobactéries, Gram(-), oxydase(-) , non sporulés, aéro-anaérobies facultatifs, fermentation de lactose à 30°C avec production de gaz et d'acide lactique.</p> <p><u>CF</u> : croissance associée à une production d'indole à partir du tryptophane à 44°C.</p>	<p>Les coliformes sont des bactéries vivants principalement dans les intestins et en abondance dans les matières fécales des animaux et de ce fait, constituent des indicateurs fécaux de la première importance.</p>	<p>.Gélose DCLA contient le désoxycholate comme inhibiteur de Gram+.</p> <p>.Bouillon VBL (vert brillant et la bile)</p> <p>.Bouillon BCPL.</p>

❖ Technique En milieu liquide « BCPL » :

La technique en milieu liquide fait appel à deux tests consécutifs, à savoir :

- test de présomption, réservé à la recherche des coliformes totaux.
- test de confirmation, appelé encore test de Mac Kenzie, réservé à la recherche des coliformes fécaux à partir des tubes positifs du test de présomption.

Test de présomption :

Le bouillon lactosé est de beaucoup le plus utilisé. En pratique, on ensemence des dilutions successives de l'eau à analyser à raison de trois tubes de milieu de culture double et simple concentration. Après inoculation on agite pour homogénéiser sans faire pénétrer d'air dans la cloche de Durham

Incubation : Se fait à 37°C pendant 24 et 48 heures.

Lecture et dénombrement : Les tubes positifs sont ceux qui présentent un virage au jaune, et un dégagement de gaz d'au moins 1/10^{ème} de la cloche.

Le dénombrement des coliformes totaux se fait par la table de Mac Grady.

Test de confirmation ou test de Mac Kenzie :

On fait un repiquage des tubes positifs sur milieu Schubert avec cloche de Durham.

Incubation :

Se fait à 44°C pendant 24 heures.

Lecture et dénombrement :

Les tubes positifs sont ceux qui présentent un trouble, et dégagement de gaz d'au moins 1/10^{ème} de la cloche de Durham, avec une formation d'un anneau rouge après adjonction de 2 à 3 gouttes du réactif de Kovacs.

Le dénombrement des coliformes fécaux se fait par la table de Mac Grady.

3°-Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux :

Tableau B.3 : Caractéristiques, les milieux sélectifs et le but de recherche des *SF*

Germe recherché	Caractéristiques	But de la recherche	Les Milieux sélectifs
<i>SF</i>	Cocci gram+, en chaînettes, catalase négative et possédant l'antigène de groupe D	Sa présence dans l'eau est un signe de contamination fécale plus ou moins récente. Leur présence dans les produits transformés (aliment)	<i>milieu de présomption</i> : Rothe, contient de l'azohydrate de sodium. <i>milieu de</i>

		indique le plus souvent non pas une contamination fécale, mais une déféctuosité du traitement thermique, de la technologie.	<i>confirmation</i> : Litsky, contient de l'azothydrate de sodium et de l'éthyl violet.
--	--	---	---

❖ Technique

Les principes généraux de cette méthode sont ceux décrits dans le cas de la colimétrie en milieu liquide.

Test de présomption :

Le test de présomption est réalisé dans le milieu de Rothe simple et double concentration

Incubation : L'incubation des tubes est faite à 37°C pendant 24 à 48h.

Lecture : Les tubes présentant un trouble microbien après incubation, sont considérés comme positifs.

Test de confirmation :

A partir des tubes positifs, on transfère à l'aide d'une pipette stérile 3 à 4 gouttes sur le milieu Litsky.

Incubation : L'incubation des tubes est réalisée à 37°C pendant 24h.

Lecture et dénombrement : les tubes présentant une pastille blanchâtre ou violette au fond du tube avec un trouble microbien ; sont considérés comme positifs, donc présence de Streptocoque fécaux.

L'expression des résultats se fait selon la méthode de NPP par référence à la table de Mac Grady.

Liste des photos

Photo 1 : Tilapia Rouge <i>Oreochromis sp</i>	page 4
Photo 2 : unité d'élevage expérimentale	page 20
Photo 3 : opération de contamination.....	page 21
Photo 4: mensuration et pesée des individus	page 25

Liste des figures

Figure 1 : Place des biomarqueurs dans l'évaluation de la contamination de 'environnement.....	page 13
Figure 2 : dispositif expérimental.....	page 21
Figure 3 : Procédures expérimentales (dosages biochimiques).....	page 28
Figure 4 : Evolution de la température durant tout le cycle expérimental.....	page 32
Figure 5 : Evolution du pH durant le cycle expérimental.....	page 33
Figure 6A : Variation des taux des nitrites durant le cycle expérimental.....	page 34
Figure 6B : Evolution des taux de l'azote ammoniacale durant le cycle expérimental..	page 35
Figure 6C : Variation de l'excrétion phosphorée durant le cycle expérimental.....	page 36
Figure 7 : Valeurs moyennes du gain en poids journalier GPJ.....	page 37
Figure 8 : Relation taille (L) - Poids (P) des tilapias en daptation.....	page 42
Figure 9 : Relation taille (L) - Poids (P) des tilapias pour les quatre groupes de test...	page 43
Figure 10 : Evolution des poids moyens (Pm) et taille moyenne (Lm) des tilapias rouges durant la période d'étude.....	page 44
Figure 11 : Etude de l'effet de l'oxyfluorène sur les rapports somatiques	page 46
Figure 12 : Etude de l'effet de l'oxyfluorène sur l'activité de la catalase dans le foie des tilapias.....	page 47
Figure 13 : Variation de l'activité protéase durant la période expérimentale.....	page 49

Liste des tableaux

Tableau 1 : systèmes antioxydants de l'organisme	page 9
Tableau 02 : Valeurs moyennes de R_{mx}	page 38
Tableau 03 : Valeurs moyennes de la Ration quotidienne de maintenance R_{mt}	page 38
Tableau 04 : Les valeurs de l'Énergie liée à la respiration R.....	page 39
Tableau 05 : les valeurs de l'énergie liée à l'excrétion U.....	page 40
Tableau 06 : les différentes valeurs de contenu calorique C.....	page 40

ABREVIATIONS

ROS : Reactive Oxygen Species

CAT : catalase

FAO : Food Organisation And Agriculture

CEE : Communauté Economique Européenne

EFSA : Autorité Européenne De Sécurité Des Aliments

C.E : Commission Européenne

US-EPA : U.S. Environmental Protection Agency

CNRDPA : Centre National de Recherche et de Développement de la Pêche et de L'aquaculture

Nm : nanomètre

Mg : milligramme

ml : millilitre

%H : teneur en eau

%MM : teneur de la matière minérale

%MO : teneur de la matière organique